

Aus dem Institut für Neuropathologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. A. Pagenstecher  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Die Wirkung von zerebral exprimiertem Interleukin-12 auf die Gliomentwicklung in  
einem transgenes Mausmodell.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Marcus Vetter aus Waldkirch i.Br.  
Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 30.03.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. A. Pagenstecher
Korreferent:	Prof. Dr. R. Müller

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Zusammenfassung (Deutsch/Englisch)</b>	<b>7</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>9</b>
2.1 Hirntumore	9
2.2 Unterscheidungsmerkmale intrakranieller Neoplasien	9
2.3 Interleukin-12 im Mittelpunkt einer molekularen Therapie für Gliome	9
2.3.1 Interleukin-12	9
2.3.2 Th1 und Th2 Zytokine und entsprechende T-Helfer-Funktionen	10
2.3.3 Der Rezeptor und die Signalwege von Interleukin-12	11
2.3.4 Die Wirkungen des Interleukin-12	11
2.3.5 IL-12 Wirkungen gegen Tumorwachstum	11
2.3.6 Tumormodelle mit Interleukin-12	12
2.4 Fragestellungen der Arbeit	16
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
3.2 Puffer und Lösungen	17
3.3 Zellkulturmedien und Geräte	19
3.4 Farbstoffe	20
3.5 Antikörper	20
3.6 Operations-Materialien für den stereotaktischen Eingriff	20
3.7 Herkunft der Tumorzellen	20
3.8 Arbeit mit der Zellkultur	20
3.9 Zusammensetzung Gefriermedium	21
3.10 Vorbereitung für Zellenimplantation	21
3.11 Versuchstiere	21
3.12 Ermittlung des Genotyps	22
3.12.1 DNA-Isolierung	22
3.12.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
3.12.3 Zusammenstellung des Mastermix für die PCR	23
3.12.4 DNA-Nachweis durch Gelelektrophorese	23

3.13 Operation	24
3.13.1 Operationsmethodik Stereotaxie	24
3.13.2 Beschreibung des stereotaktischen Eingriffes	25
3.14 Klinische Verlaufskontrollen	26
3.15 Magnetresonanztomographie	27
3.16 Morphologie	27
3.16.1 Entnahme von Gehirn und Fixierung	27
3.16.2 Kryostatschnitte	27
3.16.3 Immunohistochemie	28
3.16.4 Übersicht der Funktionen der getesteten Antigene	28
3.17 Tumervolumenbestimmung	28
3.17.1 Perfusion der Versuchstieren mit Paraformaldehydlösung	28
3.17.2 Erstellen von Vibratomschnitten und Volumenbestimmung	29
3.17.3 Volumenberechnung	29
3.18 Rnase Protection Assay (RPA)	29
3.18.1 RNA-Quantifizierung durch Rnase Protection Assay	29
3.18.2 Herstellung einer Sonde	30
3.18.3 Synthese des radioaktiv markierten Sonden-Satzes	30
3.18.4 Hybridisierung	32
3.18.5 RNase-Behandlung	32
3.18.6 Gießen des Elektrophorese-Gels	32
3.18.7 Reinigung und Präzipitation	32
3.18.8 Gelelektrophorese	33
3.19 Zelluläre Immunologie	33
3.19.1 Depletionsexperimente	33
3.19.2 Lymphozytenfreie Versuchstiere (CRAG Tiere)	33
3.19.3. IFN-gamma K.O. Mäuse (IC-Tiere)	34

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>35</b>
4.1 Etablierung des Tumormodells	35
4.1.1 Koordinaten / Operationszeiten für das Tumormodell	35
4.2 Klinischer Verlauf bei den Versuchstieren C57BL/6	36
4.2.1 Übersicht der klinischen Symptome am Sektionstag (4 Wochen)	37
4.2.2 Klinischer Verlauf - Scoring	38
4.2.3 Postoperativer Gewichtsverlauf 14 Tage nach Tumorimplantation	39
4.2.4 Postoperativer Gewichtsverlauf: Tabelle	40
4.2.5 Postoperativer Gewichtsverlauf direkt nach Tumorimplantation	40
4.2.6 Postoperativer Gewichtsverlauf ab Post-OP-Tag 0: Tabelle	41
4.3 Histologische Befunde der implantierten Tumore	42
4.3.1 H.E. Histologie des cerebellären Tumors GL261 (Wt-Tier)	43
4.4 Immunohistologische Darstellung	44
4.5 Zytokinexpression auf mRNA-Ebene dargestellt	50
4.6 Darstellung der Tumore in einer kraniellen MRI	53
4.7 Der makroskopische Tumorbefund	53
4.7.1 Makroskopische Tumorbefunde in GF-IL12 und Wt Tieren	55
4.8 Tumorumfassenbestimmung	56
4.8.1 Histologie zur Bestimmung der Tumorumfassen in GF-IL12 und Wt-Tier	57
4.9 Korrelation von Tumorumfassen und klinischem Verlauf	57
4.9.1 Tumorumfassen/Symptomscore (Wt)	59
4.9.2 Tumorumfassen/Symptomscore (GF-IL12)	59
4.9.3 Übersicht der Tumorumfassen, Symptomen und Grading-Score	60
4.9.4 Übersicht: Tumorumfassen der Wt und GF-IL12 tg Tieren	61
4.10 Depletionsexperimente	61
4.10.1 Depletion von CD8+ T-Zellen	61
4.10.2 Konzentration der CD8+ T-Zellen nach Anti-CD8 Applikation	62
4.10.3 Datenübersicht CD8+ T-Zellen Depletion	62
4.10.4 CD8-Depletion drei Wochen nach Tumorimplantation	63
4.10.5 Depletion von CD4+ T-Zellen	63
4.10.6 Tumorumfassen CD8+,CD4+-T-Zell-Depletion	64
4.10.7 Depletionsergebnisse für CD8 u. CD4 Depletion	64

4.11 CRAG-Tiere	64
4.11.1 Versuchstiere ohne B- und T-Lymphozyten (CRAG Tiere)	64
4.11.2 Übersicht des Gewichtsverlaufes der GF-IL12 Crag Tiere	65
4.12 INF-gamma Knock-out Versuchstiere (IC-Tiere)	66
<b>5. Diskussion</b>	67
5.1 Methodenkritik	67
5.2 IL-12 tg Tiere hatten eine mildere oder keine Symptomatik	67
5.3 Tumorkachexie wird durch Stoffwechselbeeinflussung des Tumors verursacht	68
5.4.1 Tumore in den GF-IL 12 tg Tieren sind deutlich kleiner oder nicht nachweisbar	69
5.4.2 TGF-beta unterdrückt die Tumorabstoßung	70
5.4.3 Eine erschwerte Diapedese von immunkompetenten Zellen verhinderte eine vollständige Abstoßung des Tumors GL261	70
5.5.1 CD8+ T-Zellen bewirken eine Abstoßung des Tumors GL261	70
5.5.2 Der Effekt auf die Tumorabstoßung durch NK-Zellen ist gering	72
5.6 Die zelluläre Tumorabstoßung in unserem Modell ist unabhängig von INF-gamma	72
5.7 Zukünftige Entwicklungen – Ausblick	74
<b>6. Literatur</b>	76
<b>7. Abkürzungen</b>	85
<b>8. Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	88
<b>9. Danksagung</b>	89
<b>10. Tagungsbeitrag</b>	90

## 1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung von Interleukin-12 (IL-12) auf einen murinen stereotaktisch implantierten Hirntumor.

Anhand zahlreicher Tumormodelle wurde bereits belegt, dass IL-12 eine Hemmung auf das Wachstum von Tumoren ausübt. Teilweise konnte dies auch schon im humanen Bereich gezeigt werden.

Es wurde ein Tumormodell etabliert, bei dem  $3 \times 10^4$  Gliomzellen vom Typ GL261 stereotaktisch in das Cerebellum von Versuchsmäusen implantiert wurden.

Dann wurde untersucht, welche Wirkung eine transgene IL-12 Überexpression auf die Tumorabstoßung hatte.

In der Literatur wurden zahlreiche Modelle beschrieben, welche Interleukin-12 mittels Viren, Genegun, Naked-DNA-Injektion oder subkutaner Injektion von extern dem Organismus zuführen. An unserem Modell untersuchten wir die endogene Überexpression von IL-12 im Cerebellum.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die GF-IL 12 tg Versuchstiere deutlich weniger Symptome hatten als Wildtypstiere. Im Durchschnitt waren die Tumorumfänge in den GF-IL 12 tg Versuchstieren um 64% kleiner als in den Wildtypstieren. Dies war statistisch signifikant. ( $p \leq 0,0013$ , Mann Whitney U-Test).

In den immunohistochemischen Untersuchungen demonstrierten wir, dass vor allem CD8+ T-Zellen das Tumorgewebe in den GF-IL 12 tg Versuchstieren infiltriert hatten. Spätere Depletionsexperimente unterstrichen die entscheidende Rolle der CD8+ T-Zellen. Zudem konnten wir die Suppressorfunktion der CD4+ T-Zellen auf die CD8+ Zellen nachweisen. Anhand von CRAG-Tieren untersuchten wir die Rolle der NK-Zellen, welche in diesem Modell eine untergeordnete Rolle spielten. Schließlich konnten wir mit IFN-gamma-K.O.-Tieren zeigen, dass für eine Rekrutierung von CD8+ T-Zellen und eine Tumorabstoßung IFN-gamma nicht gebraucht wird.

Die Standard-Therapie maligner Gliome ist auch in heutiger Zeit immer noch die chirurgische Resektion sowie eine anschließende Chemotherapie und Radiotherapie. Hier könnte eine Immuntherapie mit IL-12 bessere Verläufe ermöglichen. Die vorliegende Arbeit zeigt Grundlagen auf, wie eine endogene IL-12 Produktion eine Tumorabstoßung vermittelt. Die IL-12 Therapien bei malignen Gliomen im humanen Bereich sind allerdings noch im Studienstadium.

## Summary

This thesis examines the effect of interleukin-12 (IL-12) on a murine stereotactically implanted brain tumor.

It has already been demonstrated in a number of tumor models that IL-12 inhibits tumor growth. This could also be demonstrated to some extent in humans.

A tumor model was established in which  $3 \times 10^4$  GL261 type glioma cells were implanted stereotactically into the cerebellum of laboratory mice. The effect of transgenically expressed interleukin-12 in the cerebellum was examined in laboratory mice which over-expressed IL-12 and, for reasons of comparison, in wild-type animals. Literature describes numerous models which deliver interleukin-12 to the organism externally via viruses, gene gun, naked DNA injection or subcutaneous injection. In our model we examined endogenous over-expression of IL-12 in the cerebellum.

Our results showed that GF-IL 12 tg laboratory animals had markedly fewer symptoms than wild-type animals. On average, tumor volumes in the GF-IL 12 tg laboratory animals were 64% smaller than in the wild-type animals. This was statistically significant. ( $p \leq 0.0013$ , Mann Whitney U-Test).

In immunohistochemical tests, we demonstrated that CD8+ T-cells, in particular, had infiltrated tumor tissue in GF-IL 12 tg laboratory animals. Later depletion experiments underlined the key role of the CD8+ T-cells. We were also able to demonstrate the suppressor function of CD4+ T-cells on CD8+ cells. We examined the role of NK-cells, which have a subordinate role in this model, using CRAG animals. Finally, using IFN-gamma KO animals, we were able to show that IFN-gamma is not necessary for recruitment of CD8+ T-cells and tumor rejection.

Even today, surgical resection followed by chemotherapy and radiotherapy remains the standard therapy for malignant gliomas. Immunotherapy with IL-12 could improve courses here. This thesis shows the fundamental ways in which endogenous IL-12 production mediates tumor rejection. IL-12 therapies of malignant gliomas in humans are still at the trial stage, however.



## **2. Einleitung**

### **2.1 Hirntumore**

Die Prognose primärer maligner Hirntumore ist heute immer noch schlecht und unbefriedigend. (96) Das mittlere Überleben bei einem anaplastischen Astrozytom respektive einem Glioblastom liegt bei etwa zwölf Monaten. (23) (48)

Die Therapie der Hirntumore (im engeren Sinne der malignen Gliome) basiert auch heute noch auf einer chirurgischen Resektion, einer Radio- und Chemotherapie. (23) Die aktuelle Standardtherapie beim Glioblastoma multiforme umfasst die chirurgische Resektion, die Bestrahlung und eine Therapie mit Temozolomid. Doch auch diese Therapie brachte nur bescheidene Langzeitergebnisse und eine um zwei Monate verlängerte Überlebensrate. (16) Daher ist es erforderlich, alternative therapeutische Optionen zu suchen. (76) Eine Möglichkeit ist die Gentherapie respektive Immuntherapie. (85) (17) (70) In den vergangenen Jahren gab es immer wieder neue Erkenntnisse über die Wirkungen der einzelnen zellulären und humoralen Komponenten des Immunsystems. Insbesondere wurde den zellulären Anteilen bei der Tumorabstoßung große Beachtung geschenkt. (106) In dieser Arbeit wurde die Wirkung von cerebellär exprimiertem Interleukin-12 auf Gliomzellen der Zelllinie GL261 untersucht.

### **2.2 Unterscheidungsmerkmale intrakranieller Neoplasien**

Tumoren des ZNS sind eine heterogene Gruppe von Neoplasien. Sie unterscheiden sich nach Ursprungsgewebe, Morphologie, Wachstumstendenz, Invasivität, Progression, Rückfallrate und Ansprechverhalten auf eine Therapie. (33) Zunehmend an Bedeutung für die Unterscheidung der ZNS-Tumore und die Planung der Therapie gewinnen heute auch genetische Unterscheidungsmerkmale. (37) (82) (109)

### **2.3 Interleukin-12 im Mittelpunkt einer molekularen Therapie für Gliome**

#### **2.3.1 Interleukin-12**

Mitte der 80er Jahre wurde IL-12 gleichzeitig in mehreren Arbeitsgruppen als ein Faktor beschrieben, der die Produktion von IFN-gamma induziert und NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen stimulieren kann. Deshalb erhielt dieses Zytokin zunächst verschiedene Namen: NKSF (Natural killer stimulatory factor) (49), CLMF (Cytotoxic lymphocyte maturation factor) (110) und TSF (T-Cell stimulatory factor). (32)

Interleukin-12 ist ein Heterodimer, welcher aus einer leichten Kette mit 35 kDa (IL-12p35) und einer schweren Kette mit 40 kDa (IL-12p40) besteht. Das aktive IL-12 besteht aus den beiden Untereinheiten, die über Sulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es hat ein Molekulargewicht von 70 kDa (IL-12p70). Während die mRNA der IL-12p35-Kette in vielen verschiedenen Zellen exprimiert wird, erscheinen IL-12p40-Transkripte nur in Zellen, die biologisch aktives IL-12 Heterodimer produzieren. (88)

Seit einigen Jahren ist das Zytokin IL-23 beschrieben, welches die p40 Untereinheit des IL-12 enthält. (71) So können alle Zellen, die p40 produzieren, auch IL-23 produzieren. IL-23 hat ebenfalls, wie IL-12, einen hemmenden Effekt auf Tumorwachstum. (57)

IL-12 wird durch Phagozyten und antigenpräsentierende Zellen im ZNS als auch von Mikroglia und Astrozyten produziert. (22) (58) (93) (104) (105) IL-12 spielt auch eine wichtige Rolle bei einer Entzündung mit Bakterien und intrazellulären Parasiten. (103) Als proinflammatorisches Zytokin fördert es die Aktivierung von natürlichen Killerzellen und induziert die Bildung von IFN-gamma. (31) Des weiteren fördert IL-12 die Differenzierung der T-Helferzellen zur Th1-Antwort und hemmt die Differenzierung zur Th2-Antwort. (65) Die Funktionen der Th1- und Th2-Antwort sind in Tabelle 1 dargestellt. Ursprünglich wurde IL-12 in einer EBV infizierten B-Lymphoblasten Zelllinie entdeckt. (50)

### 2.3.2 Th1 und Th2 Zytokine und entsprechende T-Helfer-Funktionen

	<b>Zytokin</b>	<b>Hauptfunktion</b>
<b>Th1</b>	IFN-gamma	Aktivierung von Makrophagen, Proliferation von CD4+ und CD8+ T-Zellen, Hemmung der Th2-Antwort.
	TNF-alpha/beta	Proliferation von CD4+ T-Zellen, Stimulation der Entzündungsreaktion.
	IL-2	Proliferation von CD4+ und CD8+ T-Zellen, Stimulation der Bildung von Th1-Zytokinen.
	IL-12	Aktivierung von Makrophagen, Differenzierung von CD4+ T-Zellen zu Th1-Zellen, Differenzierung von CD8+ T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen, Aktivierung von NK-Zellen zur Produktion von IFN-gamma, Stimulation der Bildung von Th1-Zytokinen, Hemmung der Th2-Antwort.
<b>Th2</b>	IL-4	B-Zell-Proliferation, Hemmung der Th1-Antwort.
	IL-5	B-Zell-Proliferation.
	IL-6	Stimulation der Akutphase-Reaktion und Entzündungsreaktion.
	IL-10	Hemmung der Th1-Antwort.
	IL-13	Hemmung der Makrophagen, Stimulation der Entzündungsreaktion.

**Tab.1** zeigt die Zytokinmuster der Th1- und Th2- Antwort. Dabei ist das IL-12 typischerweise ein Zytokin der Th1 Antwort. (40)

### **2.3.3 Der Rezeptor und die Signalwege von Interleukin-12**

Der IL-12-Rezeptor (CD212) ist ein Singleprotein mit etwa 110 kDa. Er besteht aus zwei Ketten IL12R $\beta_1$  (19) (20) und IL12R $\beta_2$ . (79) Es besteht eine Ähnlichkeit zu anderen Zytokinrezeptorketten, besonders zur gp130 Kette des IL-6-Rezeptors. So konnte nachgewiesen werden, dass die IL12R $\beta_1$  UE mit der Janus-Familie Kinase Tyk2-Kinase assoziiert ist, während die IL12R $\beta_2$  UE mit der Jak2-Kinase assoziiert ist. (117) Bindet ein Ligand komplett an den Rezeptor, so kommt es zu einer Aktivierung der beiden Kinasen und der Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT4. (43) (3) Es gibt auch Hinweise, dass die zytoplasmatische Seite der IL12R $\beta_2$ UE Proliferations-signale übermitteln kann. (117)

Der IL-12-Rezeptor wurde auf aktivierten humanen T-Zellen gefunden. (101) (111) Der Rezeptor wurde auch auf ruhenden und aktivierten NK-Zellen nachgewiesen. (98) (101) Auf ruhenden T-Zellen, B-Zellen und Monozyten konnte bislang kein IL-12-Rezeptor nachgewiesen werden. (86) (101)

### **2.3.4 Die Wirkungen des Interleukin-12 (40)**

- Aktivierung von CD56+ NK-Zellen
- Unterstützung einer spezifischen CTL-Reaktion
- Induktion von T-Zell-Proliferation
- Induktion von IFN-gamma, IL-2 und TNF (Th1 Lymphozyten)
- Murines IL-12 verbessert die Differenzierung zur CD4+ T-Zellen
- IL-12 wirkt auf die Myelopoese primitiver Blutstammzellen durch die Induktion von SCF (Stem Cell Factor)
- IL-12 hemmt die tumorbedingte Neoangiogenese durch IFN-gamma

### **2.3.5 IL-12 Wirkungen gegen Tumorwachstum**

Die Wirkungen von IL-12 gegen Tumorwachstum wurde in zahlreichen Studien im Tiermodell (10) (47), in In-vitro-Studien und auch in kontrollierten Studien am Menschen getestet. (54) (78) (83) Bisher konnte jedoch kein direkter antiproliferativer Effekt des IL-12 auf Tumorzellen nachgewiesen werden. (8)

In der Literatur wird auf die wichtige Wirkung des IL-12 auf die NK- Zellen hingewiesen. (31;34;38) In einigen Tumormodellen kommt es jedoch vor allem durch aktivierte T-Zellen und unabhängig von NK-Zellen zu einer Tumorabstoßung. (42) (74) In

Nacktmäusen ist IL-12 weniger wirkungsvoll. (11) So ist anzunehmen, dass auch den T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Tumorabstoßung zukommt.

### **2.3.6 Tumormodelle mit Interleukin-12**

IL-12 spielt eine entscheidende Rolle bei der zellulären Tumorabstoßung. (11) Es gibt mittlerweile zahlreiche Studien, die IL-12 in unterschiedlichen Applikationsformen einsetzen. Bei diesem Tumormodell wurde eine neue Applikationsform gewählt. Astrozyten, vor allem im Bereich des Cerebellums, exprimierten vermehrt mRNA beider Untereinheiten des IL-12-Heterodimers unter der Kontrolle des GFAP-Promotors. (14) Bereits bei der Tumorimplantation war sehr wahrscheinlich eine erhöhte Expression vorhanden.

Ehtesham und Mitarbeiter setzten IL-12 produzierende neuronale Stammzellen (NSC) ein, um ein murines Gliom (GL26) zu therapieren. (25) Es konnte ein verlängertes Überleben in der Gruppe der Tiere nachgewiesen werden, die IL-12 produzierende Stammzellen erhielten. Mehr als 30% der behandelten Tiere überlebten länger als 60 Tage. In den verschiedenen Kontrollgruppen (Kochsalz, NSC, kein IL-12, IL-12 exprimierende Fibroblasten, beta-Galactosidase exprimierende NSC, Mock-infizierte NSC) lebte nach 60 Tagen kein Versuchstier mehr. Die Autoren konnten zudem eine Langzeitimmunität nachweisen. Histologisch fand sich in den Tumoren der IL-12 behandelten Tiere ein Infiltrat mit CD4+ und CD8+ T-Zellen.

Eine weitere denkbare Applikationsform ist die systemische Gabe, die jedoch mit Problemen behaftet ist. So sind zahlreiche dosisabhängige Nebenwirkungen beschrieben, wie zum Beispiel Nausea, Vomitus, Fieber, Diarrhöe, nachdem IL-12 zur Therapie von Menschen verwendet wurde. (54) (78)

Tannenbaum und Mitarbeiter untersuchten am Modell des murinen Kolon- und Nierenzellkarzinoms die systemische Wirkung einer IL-12 Applikation. (100) Es zeigte sich in allen mit IL-12 behandelten Tieren eine deutliche Tumorregression und eine Tumornekrose. Die Autoren konnten auch einen längerfristig anhaltenden Effekt der IL-12 Applikation aufzeigen. Die behandelten Tiere entwickelten auch noch fünf Monaten nach der letzten IL-12 Gabe keinen Tumor. Weitere Untersuchungen auf RNA-Ebene zeigten für die proinflammatorischen Faktoren TNF-alpha, IFN-gamma, IFN-

beta, IL-2, TGF-beta, MIP-1a, KC und JE eine gesteigerte mRNA Expression in behandelten wie auch unbehandelten Tieren. Allerdings fand sich eine deutlich gesteigerte mRNA Expression für CXC-Chemokine nur in den mit IL-12 behandelten Tieren.

Immunohistochemisch konnte in den IL-12 behandelten Tieren ein Infiltrat mit CD8+ und Mac-1+ Lymphozyten nachgewiesen werden. CD4+ T-Zellen konnten nur spärlich in den Tumorgeweben nachgewiesen werden.

In einem weiteren Mausmodell mit dem Blasenkarzinom MB49 wurden IL-12 haltige Vektoren mittels Adenoviren in den Tumor injiziert. (18) Die mit IL-12 behandelten Tiere zeigten eine verlängerte Überlebenszeit und hatten signifikant kleinere Tumoren. Versuchstiere, welche Adenoviren ohne IL-12-Vektor erhielten, zeigten die gleichen Tumorgößen wie die unbehandelten Tiere. Die IL-12 induzierte Tumorabstoßung war deutlich reduziert in den Tieren, welche einen monoklonalen Antikörper gegen CD4+ oder CD8+ T-Zellen erhielten. In Nacktmäusen war die Tumorabwehr sehr schlecht. Diese Experimente zeigten, wie essentiell das zelluläre Immunsystem für die Tumorabwehr ist. In einer weiteren Versuchsreihe konnten die Autoren die antagonisierende Wirkung des p40 Monomer auf die Wirkung von IL-12 nachweisen.

Eine in der Gentechnologie bekannte Methode, um genetisches Material auf Zielzellen zu übertragen, ist die so genannte „Genegun“. Dabei wird genetisches Material mittels kleiner Partikel direkt in die Zelle appliziert. In einem Modell von Rakhmilevich und Mitarbeitern wurde IL-12 cDNA mittels Genegun übertragen und die Wirkung bei verschiedenen dermatologischen Tumormodellen untersucht, darunter auch einem metastasierten Tumormodell. (RENCA, MethA, SA-1, L5178Y, P815). (81) Auch in diesen Modellen zeigten sich deutliche Erfolge. So waren die behandelten Tumore zwischen 37,5% und 87,5% kleiner als Tumore unbehandelter Geschwistertiere. Auch im Metastasenmodell P815 wurde eine Tumor-regression gefunden, diese war jedoch nur transient. In diesem Modell war die Tumorregression vor allem von CD8+ T-Zellen abhängig und nicht von CD4+ T-Zellen. Eine Depletion der CD4+ T-Zellen verbessert den IL-12 Effekt auf die Tumorgöße. Schließlich konnte gezeigt werden, dass sich durch IL-12 Applikation eine zelluläre Immunität entwickelte.

In einem weiteren P815 Tumormodell benutzten Fallarino und Mitarbeiter endogen transfizierte Tumorzellen, welche vermehrt IL-12 produzieren und sezernieren. (26) Etwa 30% der Mäuse stießen den Tumor innerhalb einer Woche ab. In bestrahlten Mäusen gab es keine Abstoßungsreaktion - offensichtlich waren diese Tiere nicht mehr immunkompetent. Die Autoren konnten einen Anstieg von CD4+, CD8+ T-Zellen und Non-T-Zell-Subpopulationen innerhalb des Lymphknotens nach Injektion der Tumorzellen nachweisen. Interessanterweise kam es in den Lymphknoten der tumorimplantierten Tiere zu einem starken IL-3 Anstieg. Ein Anstieg des IFN-gamma war jedoch nur bei ca. 30% der Tiere zu verzeichnen.

Zitvogel und Kollegen untersuchten an einem Mausmodell die genetische Tumor-Vakzinierung als weitere Therapiemöglichkeit. (116) Dabei wurden IL-12 assoziierte dendritische Zellen (DC) untersucht und am Tumormodell MCA205 (Maussarkom) eingesetzt. In den unbehandelten Tieren erreichten die Tumore ein durchschnittliches Volumen von 300 mm<sup>3</sup>. Bei Versuchstieren, die eine DC Vakzinierung mit gepulstem Tumorantigen erhielten, beobachtete man einen Wachstumsstopp für sechs Wochen, bevor es zu einem erneuten Tumorwachstum kam. Die Kombinationstherapie von IL-12 und DC/MCA205 gegen die Tumorzellen MCA205 ergab einen besseren „Outcome“ ab dem 40. Tag nach Tumorimplantation. Die Tiere überlebten insgesamt länger und hatten eine bessere Immunität gegenüber den Tumoren - gemessen an den aktivierten Splenozyten.

An einem murinen Melanommodell (BL-6) konnte gezeigt werden, dass eine parakrine Applikation von transfizierten retroviralen Vektoren auch zu einer deutlichen Tumorregression führt. (99) Die Antitumoraktivität von IL-12 war dosisabhängig. Die histologische Aufarbeitung der Hauttumore zeigte, dass in den IL-12 behandelten Tieren reichlich inflammatorische Zellen nachweisbar waren, welche durch eine fibrose Kapsel, ähnlich einem Abszess, abgeschlossen wurden. Das Immunsystem des gesamten Organismus wurde aktiviert, so dass auch Tumore an anderen Stellen abgestoßen wurden, wenn zuvor ein mit IL-12 Vektor transfizierter Tumor implantiert wurde. Interessanterweise konnte im Serum der Tiere keine erhöhten IFN-gamma Spiegel nachgewiesen werden.

Durch eine parakrine IL-12 Applikation mittels retroviraler Vektoren, die in NIH3T3 Fibroblasten eingebracht wurden, verschwanden etablierte Tumore nach 14 Tagen. Eine weitere Beobachtung dieser Arbeit war der synergistische Effekt von IL-12 und

CD28 Co-Stimulation bei der Tumorabwehr. Die CD28 Co-Stimulation über Ligation mit dem Oberflächenprotein B7.1 brachte nochmals deutliche Vorteile gegenüber einer isolierten IL-12 Applikation. Das B7.1 Antigen ist auf ruhenden T-Zellen zu finden und wird für die Stimulation von T-Zellen gebraucht. (15)

Die subkutane Applikation von IL-12 mit Hilfe einer osmotischen Minipumpe war ein Versuch, die systemische IL-12 Gabe mit mildereren Nebenwirkungen zu etablieren. (44) Die Autoren konnten an einem Ratten-Gliommodell mit 9L Gliomzellen zeigen, dass eine kontinuierliche Infusion von IL-12 das Wachstum der Tumore deutlich reduzieren konnte. Der IL-12 Effekt auf das Tumorstadium war dosisabhängig. Im Langzeitverlauf konnten die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses nachgewiesen werden. Nach erfolgreicher IL-12 Therapie wurden auch Zweitumore abgestoßen, die in das Striatum implantiert wurden.

Es gibt weitere Zytokine, insbesondere das IFN-gamma, die in dieser Arbeit untersucht wurden unter der Voraussetzung, dass IL-12 mit diesen in Interaktion stand. IL-12 werden potente Wirkungen gegen malignes Wachstum zugeschrieben. (10) (44) (56) (67) In unserem Modell wurde das transgene IL-12 untersucht, welches unter der transkriptionellen Kontrolle des GFAP-Promotors ausschließlich in Astrozyten exprimiert wurde. (14) Vor allem im Cerebellum der Versuchstiere wurde eine erhöhte Expressionsrate des IL-12 Gens nachgewiesen. Daher wurden die Tumorzellen in die weiße Substanz des Cerebellums implantiert.

## **2.4 Fragestellungen der Arbeit**

1. Wie wirkt eine erhöhte astrozytäre IL-12 Expression auf die stereotaktisch implantierten Hirntumore?
2. Kommt es zu einer Abstoßung respektive einer Reduktion des Tumorzvolumens unter einer gesteigerten endogenen IL-12 Expression und Produktion?
3. Wie unterscheidet sich der klinische Verlauf in der GF-IL12 Gruppe und Wildtypgruppe bezüglich Symptomatik, Gewichtsverlaufes und Entzündungsreaktion?
4. Welche Zellen respektive welche weiteren Faktoren/Zytokine der Th1-Antwort spielen bei der Tumoralbstoßung eine Rolle? Unter welchen Bedingungen kommt es zu einer Tumoralbstoßung? Wie lange kann eine Abstoßung im Organismus unter transgener IL-12 Produktion aufrechterhalten werden?
5. Gibt es eine spezifische Immunantwort auf ein bestimmtes Tumoralantigen?



### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

Die gängigen Reagenzien und Chemikalien wurden von den Firmen Baker (Deventer, Holland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Deisenhofen, Deutschland) erworben. Die Reaktionsgefäße, Zellkulturschalen, Pipettenspitzen und Pipetten wurden von den Firmen Gilson (Villiers-le-Bel, Frankreich) und Greiner (Frickenhäusen, Deutschland) bezogen. Objektträger, Deckgläser, Eindeckelmedium (Vitroclud) und ein Gefriereinbettmedium (Tissue-Tek) wurden von der Firma Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland) bezogen.

#### **3.2 Puffer und Lösungen**

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit autoklaviertem, in Milli-Q-Filtereinheiten gereinigtem Wasser (Millipore, Eschborn, Deutschland) hergestellt.

##### **5% Acrylamid**

420,4 g Harnstoff (7M), 125 ml 40% Acrylamid-bis(19:1)-Lösung. Der Harnstoff wurde in 500 ml H<sub>2</sub>O und 50 ml 10x TBE auf einer Wärmeplatte gelöst. Das Acrylamid wurde hinzugefügt und das Volumen auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wurde über einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert und lichtgeschützt aufbewahrt.

##### **10% Ammoniumpersulfat**

0,2 g Ammoniumpersulfat (Pharmacia, Uppsala, Schweden) werden in 2ml Wasser gelöst.

##### **Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC)**

Herstellung der Lösung nach Protokoll des Herstellers.

##### **Hefe-tRNA**

10 mg/ml Hefe-tRNA (Boehringer-Mannheim, Deutschland) in 10 mM Tris pH 8,0.

##### **Hybridisierungspuffer (1x)**

40 mM PIPES (pH 6,4), 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA in Formamid.

### **DNA-Ladepuffer (6x) für Agarosegel**

0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 30% (v/v) Glyzerin in H<sub>2</sub>O.

### **RNA-Ladepuffer für Polyacrylamidgele**

80 % Formamid (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland), 1 mg/ml Xylencyanol FF, 1 mg/ml Bromphenolblau, 10 mM EDTA (pH 8,0). Wurde bei -20°C aufbewahrt.

### **Lyse-Puffer**

200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 5 mM EDTA, 0,2% (w/v) SDS (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 100 mg/ml Proteinase K (Peqlab, Erlangen, Deutschland).

### **PFA**

Ansatz der 4% PFA Lösung in 1xPBS zur Perfusion der Tiere. 40 g Paraformaldehyd Pulver bei ca. 60°C in 900ml entionisiertem Wasser anrühren. (Vorerhitzen im Mikrowellenofen) Einen Tropfen gesättigte NaOH zugeben und warten, bis die Lösung ganz klar wird. Filtrieren und 100ml 10x PBS zugeben. Teilweise wurden die Versuchstiere auch mit 4% Formalinlösung in PBS perfundiert.

### **PBS (1x)**

9 g pro Liter NaCl, 0,703g pro Liter di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O) 0,232g pro Liter Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) in Wasser.

### **Proteinase K (für 25 Proben)**

200 µl Wasser, 150 µl SDS (10%), 60 µl Proteinase K (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O bidest), 40 µl Hefe-tRNA (10 mg/ml).

### **RNase-Puffer (2,5 ml)**

0,25 µl Tris-HCl (1M, pH 7,5), 15 µl NaCl (5 M), 0,25 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0), wurde mit Wasser auf 2,5 ml aufgefüllt und vor Benutzung 5 µl RNase A (100 mg/ml, Boehringer, Mannheim, Deutschland) und 1 µl RNase T1 (125 U/ml, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) hinzugegeben.

**SDS (sodium dodecyl sulfat, 10%)**

10% (w/v) SDS (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in Wasser.

**TE (Tris-EDTA) pH 8,0**

10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)

**Verdünnungslösung für Antikörper**

1% (w/v) bovines Serum-Albumin (BSA); 0,1% Natriumazid in 1x PBS.

**DAB Stocklösung**

1 DAB-Puffertablette (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde in 10 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde filtriert. Die gebrauchsfertige Lösung wurde kurz vor dem Auftragen auf die histologischen Schnitte mit 1 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 1 ml DAB-Stock-Lösung versetzt.

**3.3 Zellkulturmedien und Geräte**

Casy-one Zellcounter, (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland), Inkubator BB 6220 Cu, (Heraeus, Hanau, Deutschland), Mikroskop Diaphot-TMD, (Nikon, Tokio, Japan), Sterile Werkbank Technoflow, (Integra Bioscience, Holton Laminair, Allerød, Dänemark), Wasserbad GFL 1086, (GFL, Burgwedel, Deutschland), Casy System, (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland), DMSO, (Merck, Darmstadt, Deutschland), Fötales Kälberserum (FCS), (Gibco, Eggenstein, Deutschland), Gewebekulturflaschen 25 u. 50 cm<sup>2</sup>, (Falcon, Plastics Oxnard, Calif., USA), Petrischalen für Gewebekultur, (Falcon, Plastics Oxnard, Calif., USA), Penicillin-Streptomycin (10 mg/ml), (Gibco, Eggenstein, Deutschland), Trypsin-EDTA, (Gibco, Eggenstein, Deutschland), Steriles PBS (Gibco, Eggenstein, Deutschland), Mycoplasmen Test auf PCR Basis (Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland), Anti-PPLO Mycoplasmenantibiotikum, (Gibco, Eggenstein, Deutschland), Dulbecco's Mem mit Glutamax-I, (Gibco, Eggenstein, Deutschland), Ringer-Lactatlösung, (B. Braun, Melsungen, Deutschland)

### 3.4 Farbstoffe

Krysviolett, (Waldeck Division Chroma, Münster, Deutschland), Hämalun (Merck, Darmstadt, Deutschland), Eosin, (Merck, Darmstadt, Deutschland)

### 3.5 Antikörper

Primärer AK	Verdünnung	Hersteller
CD4 (L3T4)	1:2000	PharMingen, Hamburg, Deutschland
CD 8a (Ly-2)	1:2000	PharMingen, Hamburg, Deutschland
CD 31	1:500	PharMingen, Hamburg, Deutschland
Ki-67	1:100	PharMingen, Hamburg, Deutschland
Mac-1	1:1000	MPI für Immunbiologie, Freiburg, Deutschland
CD45 R	1:2000	PharMingen, Hamburg, Deutschland
Vimentin	1:100	PharMingen, Hamburg, Deutschland
GFAP	1:3	Boehringer Mannheim, Deutschland
Anti-CD8 mAB	1:3	Institut für Immunologie, Universität Freiburg, Freiburg, Deutschland
Anti-CD4 mAB	1:3	Institut für Immunologie, Universität Freiburg, Freiburg, Deutschland

**Tab. 2** Antikörper für Immunohistochemie und Depletionsexperimente

### 3.6 Operations-Materialien für den stereotaktischen Eingriff

Operations-Besteck, (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland), Stereotaxieeinheit (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA)

### 3.7 Herkunft der Tumorzellen

Die Zelllinie GL261 erhielten wir freundlicherweise von Frau PD Dr. med. Machein. Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinik Freiburg. Im Jahre 1939 konnte das Gliom mit dem Zelltyp GL261 erstmals von Seligmann and Shear mit dem Karzinogen Cholangiotren induziert werden. (89) In einer Übersichtsarbeit von 1970 beschreiben Ausmann und Shapiro in verschiedenen Versuchsreihen das Verhalten, die Wachstumstendenz und die Histologie des Tumors GL261 in der Maus. (2) (90) Es gibt zahlreiche Gliom-Modelle, die diese Zelllinie nutzten. (41) (55) (68) Seit den 1990er Jahren sind in vitro Zellkulturen von diesem Zelltyp verfügbar.

### 3.8 Arbeit mit der Zellkultur

Die Tumorzellen wurden in Flüssigstickstoff gelagert. Zur Vorbereitung der Lagerung wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und dann von der Zellkulturplatte geerntet. Es wurde eine Zellsuspension mit 10%igem DMSO hergestellt und in Kryogegefäße aliquotiert. (Siehe Tab. 3, Abschnitt 3.9) Die Aliquots wurden für 24 Stunden bei –80°C eingefroren, bevor sie schließlich in Flüssigstickstoff gelagert wurden. Das Auf-

tauen erfolgte möglichst schnell im Warmwasserbad, anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Pellet im neuen Medium aufgelöst. Schließlich wurden die Tumorzellen in eine vorbereitete Gewebekulturflasche überführt.

Die Zellen wurden in Dulbecco's Medium inkubiert, das mit 10% FCS und einer Antibiotikamischung aus Penicillin-Streptomycin versetzt wurde. Die Kultur erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C unter Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft in einem Brutschrank. Die Zellen wurden täglich auf Wachstum und morphologische Veränderungen untersucht. Regelmäßig wurde ein Test auf Mycoplasmen durchgeführt. Dazu wurde ein PCR-Kit der Firma Minerva Biolabs, Berlin, verwendet. Kontaminierte Kulturen wurden verworfen.

Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage.

Eine Zellkultur-Platte von 25cm<sup>2</sup>, die mit 4x10<sup>5</sup> Tumorzellen initial versehen wurde, war nach fünf bis sieben Tagen vollständig besiedelt, so dass eine Teilung notwendig wurde. Mit Hilfe von Trypsin-EDTA wurden die Zellen von der Platte getrennt. Anschließend wurde zentrifugiert und resuspendiert. Ein Fünftel dieser Zellsuspension wurde wieder in die Zellkultur gegeben.

### 3.9 Zusammensetzung Gefriermedium

Gefriermedium	Volumen
Zellsuspension in DMEM + 10% FCS + Antibiotika gelöst (mind. 2x10 <sup>5</sup> /Stock)	500 µl (45%)
Fötale Kälberserum	500 µl (45%)
DMSO	111 µl (10%)

Tab. 3 Zusammensetzung des Gefriermedium

### 3.10 Vorbereitung für Zellenimplantation

Zunächst wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA gelöst und mit Medium abzentrifugiert. Dann wurde die Zellkonzentration auf 10.000 Zellen/µl PBS eingestellt. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension für fünf Min. bei 800 U/Min. Mit einer Pasteurpipette wurde der Überstand vorsichtig abgezogen, dabei wurde ein Restüberstand belassen. Dann wurde minimal weniger PBS als das Zielvolumen zupipetiert. Die Zellen wurden während der Operation bei ca. 3°C auf Eis gelagert.

### 3.11 Versuchstiere

Für die Experimente wurden Wildtyp (Wt), GF-IL12 tg, CRAG und IFN-gamma-K.O.-Versuchstiere auf einem C57BL/6 Maushintergrund verwendet. Für die ersten Experimente wurden sechs bis zehn Wochen alte männliche und weibliche Wildtypmäuse

(im folgenden Text auch als Wt bezeichnet) und heterozygote transgene Mäuse (im folgenden auch als GF-IL12 tg oder transgen bezeichnet) auf einem genetischen C57BL/6 X SJL Hybridhintergrund verwendet. In GF-IL12 tg Mäusen wird IL-12 unter transkriptioneller Kontrolle des GFAP-Promotors spezifisch in Astrozyten exprimiert. Die höchste Expression der IL-12 mRNA war im Kleinhirn nachweisbar, weshalb die Tumorzellen in diese Hirnregion implantiert wurden. Die CRAG Tiere waren homozygot für das RAG-2 Gen und transgen für GF-IL12. Diese Tiere hatten keine funktionstüchtigen T- und B-Lymphozyten. Die Versuchstiere wurden freundlicherweise von Prof. Pagenstecher zur Verfügung gestellt. Der genetische Hintergrund und Angaben zu den Rückkreuzungen können (73) und (39 b) entnommen werden.

Die Versuchstiere wurden präoperativ in der hochsterilen SPF-Einheit der Universitätsklinik Freiburg gehalten. Postoperativ wurden die Tiere im einfacher zugänglichen Tierstall des Neurozentrums der Uniklinik Freiburg gehalten und überwacht.

### **3.12 Ermittlung des Genotyps**

#### **3.12.1 DNA-Isolierung**

Für die Isolierung der DNA wurde ein Protokoll von Laird mit minimalen Veränderungen angewendet. (51) Die Tiere wurden im Alter von 10-14 Tagen „getailt“, das heißt, es wurde ein etwa 0,5 mm langes Stück der Schwanzspitze abgeschnitten und dann für etwa 8 Stunden in 500 µl Lyse-Puffer bei 56°C auf dem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verdaut. Das Lysat wurde dann für fünf Min. bei 14.000 U/Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol überführt. Nachdem die Probe kräftig geschüttelt wurde (Vortexen), sah man ein deutliches DNA-Präzipitat. Dieses wurde in 100 µl TE (pH 8,0) aufgenommen und für etwa eine Stunde bei 60°C auf dem Thermoschüttler resuspendiert. Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die gelöste DNA 1:100 in Wasser verdünnt und ihre optische Dichte bei 260, 280 und 320 nm im Spektrophotometer (Pharmacia, Uppsala, Schweden) bestimmt.

#### **3.12.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR dient der Amplifikation beliebiger DNA-Abschnitte, die durch die Wahl zweier spezifischer Primer (Oligonukleotide) eindeutig gekennzeichnet sind. Die Primer hybridisieren mit jeweils einem der beiden DNA-Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes, der mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase belie-

big vervielfältigt werden kann. Die Oligonukleotide wurden vom Institut für Biologie III der Universität Freiburg bezogen. Folgende Nukleotide wurden zur Bestimmung des Genotypes als Primer verwendet.

Oligonukleotid	Bindungsort an der DNA	Sequenz von 3' nach 5'
IL-12p35	5'	AGA ATT CGC AGT CTC TGA ATC ATA A
IL-12p40	5'	AGA ATT CCC TCA AGT TCT TTG TTC GAA
hGH	3'	TTA CAA GCT GGC ACT GGA GTG GCA ACT T

**Tab. 4** Primer für IL-12

Der hGH-Primer diente sowohl für IL-12p35 als auch für IL-12p40 als gegenläufiger Primer, da bei der Klonierung zur Herstellung des transgenen Konstruktes die Untereinheiten von IL-12 beide mit dem Polyadenylierungs-Signal von hGH verbunden wurden. Mit dieser Wahl des 3' Primers wurde gewährleistet, dass nur transgene IL-12-Fragmente nachgewiesen wurden, da die hGH-Sequenz im Wt Mausgenom nicht vorkommt.

### 3.12.3 Zusammenstellung des Mastermix für die PCR (Ansatz für ein Sample)

Reagenz	Volumen [µl]	Konzentration der Lösung	Endkonzentration	Hersteller
MgCl <sub>2</sub>	1	50 mM	2 mM	InViTek, Berlin, Deutschland
PCR-Puffer	2,5	10x	1x	Pharmacia, Uppsala, Schweden
dNTP's	0,5	10 mM	0,2 mM	Pharmacia, Uppsala, Schweden
5'Primer p35	0,08	54,48 ng/µl	0,17 ng/µl	Institut für Biologie III, Freiburg, Deutschland
5'Primer p40	0,25	44,33 ng/µl	0,44 ng/µl	Institut für Biologie III, Freiburg, Deutschland
3'Primer hGH	0,25	70,20 ng/µl	0,70 ng/µl	Institut für Biologie III, Freiburg, Deutschland
Taq-Polymerase	0,1	5000 U/ml	0,02 U/µl	Pharmacia, Uppsala, Schweden
DNA	X	X	0,2 µg	X

**Tab. 5** zeigt die Zusammenstellung des Mastermixes für die PCR

Die PCR wurde jeweils in einem 25 µl-Ansatz in einem Thermal Cycler (PTC-200, MJ Research, USA) durchgeführt. Es galten folgende Reaktionsbedingungen, die eine extrem schnelle Amplifikation erlaubten. (Modifiziertes Protokoll nach (59))

### 3.12.4 DNA-Nachweis durch Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer Agarose-Gelmatrix, die unter Spannung versetzt wurde, konnten die in der PCR entstandenen DNA-Fragmente nach Größe aufgetrennt werden. Das 1%ige Agarosegel wurde wie folgt hergestellt: 0,4 g LE-Agarose (Boehringer, Mannheim) wurde abgewogen und mit 40 ml 1xTAE versetzt, dann in der Mikrowelle bei 180

Watt für eine Minute erhitzt. Dann wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt und schließlich das Gel in eine präparierte Elektrophoresekammer (Peglab, Erlangen: Easycast) gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde die Gelkammer mit 1xTEA gefüllt und der Kamm entfernt. Das PCR-Produkt wurde im Verhältnis 1:6 mit 6x Ladepuffer versetzt und 12 µl der Lösung in die Geltaschen zusammen mit einem Längenstandard geladen. Das Gel wurde mit einer Spannung von 100 V gefahren. Nach etwa 20 Min. konnte das Gel unter dem UV-Schirm begutachtet und dokumentiert werden. Bei den GF-IL 12 tg Tieren zeigte sich eine Bande von 800 Basenpaaren (bp), welche dem GF-IL12p40 entsprach. Die Wildtyp-Kontrolltiere zeigten keine Bande auf. Damit wurde der Genotyp der Versuchstiere eindeutig bestimmt. In seltenen Fällen konnte auch die GF-ILp35-Bande nachgewiesen werden. Zur eindeutigen Identifizierung genügte jedoch die p40 Bande.

### **3.13 Operation**

#### **3.13.1 Operationsmethodik Stereotaxie**

Das Operationsbesteck wurde am Tag vor dem Eingriff autoklaviert. Auch PBS und MQ-Wasser wurden vor der Operation in einem speziellen Autoklaven sterilisiert. Die bereitgestellten OP-Tücher, OP-Bekleidung und Unterlagen kamen steril aus der Wäscherei, die auch den Klinik-OP versorgte. Der Operateur trug während der OP einen sauberen Kittel und normale unsterile Handschuhe, die während der OP immer wieder mit 70%igem Alkohol desinfiziert wurden.

Bei der stereotaktischen Implantation wurde anhand von prominenten Knochenpunkten wie beispielsweise der Lambda-naht ein genaues intrakranielles Zielgebiet berechnet. Bei den ersten Experimenten wurde ein Stereotaxieatlas verwendet. (53) Es waren mehrere Versuchsimplantationen notwendig, bis die genauen und reproduzierbaren Zielkoordinaten für unseren Mausstamm C57BL/6 etabliert waren. Zunächst wurde in das striatale Kerngebiet implantiert. Nachdem das striatale Tumormodell etabliert war und die GL 261 Gliomzellen dort anwuchsen, wurde das Modell für das Cerebellum etabliert. Ziel war es, die Zellsuspension möglichst zentral in die weiße Substanz des Kleinhirns zu injizieren. Die Methode sollte bei jedem Eingriff reproduzierbar beherrscht werden.



### **3.13.2 Beschreibung des stereotaktischen Eingriffs an den Versuchstieren**

An jedem Operationstag wurden zwischen vier und zwölf Tiere operiert. Die Operationen wurden im Tieroperationssaal des Neurozentrums der Universitätsklinik Freiburg durchgeführt. Ein Verhältnis von GF-IL12 Tieren zu Wildtyptieren von 1:1 wurde meistens eingehalten. Nachdem das Versuchstier in einer Plexiglasbox mit einem O<sub>2</sub>/Isofluran Gasmisch in eine oberflächliche Inhalationsnarkose versetzt wurde, wurde das Operationsfeld (Haut zwischen den Ohren) rasiert. Das Tier wurde dann auf eine Wärmeplatte gelegt und in die Stereotaxieeinheit eingespannt. Die Tiefe der Narkose wurde anhand der Atemfrequenz und des Atemtyps beurteilt. Die optimale Isoflurankonzentration lag zwischen 1,2 und 2,3 Volumen%. Nachdem das Tier sicher fixiert war und die Narkose tief genug war, wurde zunächst das Operationsfeld zweimalig mit 75%igem Ethanol desinfiziert. Alle Schichten der Haut wurden mit einer kleinen chirurgischen Schere eröffnet. Der Schnitt wurde vom kraniokaudalen Übergang bis zu einem Bereich etwa fünf mm vor den Augen geführt. Die Haut wurde dann mit zwei Wundhaken nach lateral mobilisiert, so dass die gesamte Schädelkalotte mit den zur Orientierung wichtigen Knochennähten frei zu überblicken war. Es folgten die stereotaktischen Berechnungen und Einstellarbeiten.

Zunächst wurde die Hamilton-Spritze mit der Zellsuspension vorbereitet, da sie für die Justierung und Berechnung notwendig war. Die Spritze wurde mit 75%igem Ethanol desinfiziert und dann in sterilem PBS mehrmals gespült. Mittels einer 200 µl Pipette wurden die Zellen zwei- bis dreimal resuspendiert. Vor jedem neuen Eingriff musste dies wiederholt werden, da sich die Zellen rasch absetzen. Der Stempel und die Kanüle der µl-Spritze wurden entfernt und auf eine sterile Ablage gelegt, so dass eine einfache Befüllung möglich war. Mit einer 20 µl Pipette wurde die Hamilton-Spritze von der hinteren Öffnung luftfrei befüllt. Anschließend wurden die Kanüle und der Stempel wieder montiert. Unter Sichtkontrolle wurde sichergestellt, dass bei Betätigung des Stempels ein entsprechendes Volumen der Zellsuspension aus der Kanüle austrat. Die Hamilton-Spritze wurde dann in die Stereotaxieeinheit eingesetzt und fixiert. Die Stereotaxieeinheit erlaubte ein dreidimensionales Arbeiten mit einer Genauigkeit von 0,1 mm. Als Ursprung wurde die Kreuzung der Lambdanaht mit der Sagitalnaht festgelegt. Für die zielgenaue Implantation in das Kleinhirnmark der rechten Hemisphäre ergaben sich folgende Koordina-

ten: X = 1,00 mm (rechts der Mittellinie), Y = 2,50 mm (unter der Dura- mater), Z = 2,50 mm (rostral des Kreuzungspunktes von Lambda- und Sagitalnaht).

Mit diesen Koordinaten wurde reproduzierbar eine zielgenaue Injektion ins Kleinhirnmarm erreicht. Die Kanüle wurde dann auf die Kreuzung der beiden Schädelnähte genau eingestellt. Dann wurden die Koordinaten der Kreuzung abgelesen und im OP-Bericht notiert. Es erfolgte die Berechnung und Bestimmung der Zielkoordinaten. Zunächst wurden nur die X- und Y-Koordinate bestimmt, eingestellt und markiert. Mit dem Bohrer wurde bei mäßiger Geschwindigkeit (ca. 3.000 U/Min.) ein Bereich von ca. 2-3 mm um das Bohrloch abgetragen, dann wurde mit höherer Geschwindigkeit (zirka 20.000 U/Min.) ein bis nahezu durch die Schädelkalotte reichendes Loch gebohrt. Die Bohrtiefe betrug etwa 0,3 - 1,0 mm. Es wurde nicht komplett trepaniert, sondern der verbliebene Anteil der Kalotte wurde mit der Kanüle durchstoßen. Nachdem das Bohrloch gesetzt war, wurde die Tiefen-Koordinate (Z) bestimmt. Dazu wurde die Spitze der Kanüle ganz leicht unter das Oberflächenniveau der Kalotte gebracht, ca. 0,1-0,2 mm, die Koordinate bestimmt und dann die Nadel in Position gebracht. Um den Zellen genügend Raum zu schaffen, wurde die Kanüle 0,3 mm tiefer geschoben und dann wieder auf die Zielkoordinate zurückgezogen. Dann wurde mit der Injektion begonnen.

Das Zielvolumen betrug 3 µl Zellsuspension mit einer Konzentration von  $10^4$  Tumorzellen/µl. Die Injektion wurde sehr langsam durch vorsichtiges Drehen und Schieben am Stempel über fünf Minuten durchgeführt. Im gesamten Kollektiv wurde kein intraoperativer Exitus beobachtet. Nachdem über fünf Minuten die Injektion durchgeführt wurde, verblieb die Kanüle für weitere zehn Minuten im Zielgebiet. Schließlich wurde die Kanüle während fünf Minuten aus dem Zielgebiet entfernt.

### **3.14 Klinische Verlaufskontrollen**

Postoperativ wurden die Tiere zwischen 21 und 28 Tage beobachtet. Am ersten postoperativen Tag wurden die Versuchstiere zweimal visitiert, um direkte Folgen, wie Blutungen oder fokale Läsionen durch den stereotaktischen Eingriff zu erkennen. Ab dem 2. postoperativen Tag wurden die Tiere täglich untersucht. Auf folgende klinische Merkmale wurde besonders geachtet: Allgemeinzustand, Verlangsamung des Tieres, Verhalten (in der Gruppe), Ataxie, Kachexie (Gewichtsmessungen), Paralyse, Plegien.

Die Mäuse wurden aus dem Käfig genommen und bei guter Beleuchtung untersucht. Zur Prüfung der Koordination wurde die Maus auf den schmalen Käfigrand gesetzt und dann beobachtet, ob sie Balance und Gleichgewicht halten konnte. Der Beginn von Symptomen wurde notiert. Ein Teil der Wt-Tiere und GF-IL12 transgenen Tiere wurde alle zwei Tage gewogen.

### **3.15 Magnetresonanztomographie**

Bei einer kleinen Anzahl an Tieren aus beiden Gruppen wurden Magnetresonanztomographien drei Wochen nach der Tumorimplantation angefertigt. Ziel der Untersuchung war, radiologische Veränderungen durch den Tumor nachzuweisen:

Bluthirnschrankenstörungen, Hirnödeme und Tumoreinbrüche (Ausdehnung) in das Ventrikelsystem usw.

Zudem konnte eine radiologische Volumenbestimmung des Tumors mit der histologischen Größenbestimmung korreliert werden. Die routinemäßige Volumenbestimmung wurde aus Zeit- und Kostengründen nur histologisch durchgeführt.

### **3.16 Morphologie**

#### **3.16.1 Entnahme von Gehirn und Fixierung**

Das Versuchstier wurde mit Isofluran in tiefe Narkose versetzt und dekapitiert. Die Kalotte wurde dann mit einer kleinen Schere lateral eröffnet. Das Gehirn wurde mobilisiert und vorsichtig von der Schädelbasis gelöst. Dann wurde das Gehirn in Längsrichtung medial mit einer Rasierklinge geteilt und mit TissueTec auf einem Stück Kork für die Kryostatschnitte eingebettet. Das Präparat wurde in gekühltem Methylobutan auf etwa -70 °C eingefroren und bei dieser Temperatur auch gelagert.

#### **3.16.2 Kryostatschnitte**

In einem Kryostaten (Kammertemperatur -17 °C, Objekttemperatur -17°C) wurden 12 µm dicke Sagitalschnitte der schockgefrorenen Hemisphären hergestellt. In den ersten Versuchsreihen wurden nur Wildtyp Tiere operiert und untersucht. Ziel war es, reproduzierbare Tumore im Cerebellum zu etablieren. Abwechselnd wurde eine Schnittserie für H.E. und IHC hergestellt:

- a) Hematoxylin und Eosin zur Tumor-, Stichkanalsuche, Darstellung der H.E. typischen Morphologie
- b) Immunohistochemie zur Typisierung infiltrierender Leukozyten

In den H.E. Schnitten konnte die Zellmorphologie des Tumors untersucht werden. Besonders auf Nekrosen, Neovaskularisation und Mitosen wurde geachtet. Aber auch der Ausdehnungsgrad und die Infiltration konnte im H.E. Schnitt beurteilt werden.

### 3.16.3 Immunohistochemie

Zur Charakterisierung der immunologischen Veränderungen in den untersuchten Gehirnen wurde die Immunohistochemie verwendet. Kryostatschnitte wurden auf einen Superfrost Objektträger gezogen, dann wurden die Färbungen nach Vorschriften des Herstellerprotokolls durchgeführt. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die eingesetzten Antikörper und die Funktion des Antigens im Organismus.

### 3.16.4 Übersicht der Funktionen der getesteten Antigene

Antikörper	Funktion des Antigens/Marker
Anti-CD4	Oberflächenantigen von T-Zellen (T-Helferzellen)
Anti-CD8	Oberflächenantigen von T-Zellen (Zytotoxisch)
Anti-CD45 R	Oberflächenantigen von B-Zellen
Anti-Ki67	Proliferationsmarker
Anti-CD31	Blutgefäßmarker
Anti-Mac1	Membrane attac complex, Makrophagen
Anti-Vimentin	Intermediärfilament in mesenchymalen Zellen
Anti-GFAP	Saures Gliafaserprotein, Astrozyten

**Tab. 6** Übersicht der Funktionen der getesteten Antigene

## 3.17 Tumolvolumenbestimmung

### 3.17.1 Perfusion der Versuchstiere mit Paraformaldehydlösung (PFA)

Zur Herstellung von Vibratomschnitten für eine Volumenbestimmung der Hirntumore wurden die Mäuse mit 4% Formalin in PBS perfundiert. Dazu erhielt das Tier eine kurzzeitige Inhalationsnarkose mit Isofluran und wurde dann mit 10%igem Ketanest und 2%igem Rompun in eine tiefe Narkose versetzt. Die Maus wurde dann fixiert. Die Bauchdecke wurde eröffnet und dann nach kranial geklappt. Das Diaphragma wurde mit einer stumpfen Schere an der unteren

Thoraxapertur abgetrennt. Der Thorax wurde seitlich mobilisiert und die vordere Thoraxwand mit einer Klemme nach kranial aufgerichtet. Das Herz wurde mit dem Zeigefinger fixiert und die linke Herzkammer mit einer Kanüle 20 G punktiert. Dann wurde mit der Ringer-Lösung gespült. Nach etwa drei Minuten wurde die Spülung beendet und Formalin wurde infundiert. Es folgte eine Perfusionsphase von etwa zehn Minu-

ten. Nach der Fixation wurde die Maus dekapitiert und dann das Gehirn entnommen. Das Gehirn wurde für 24 Stunden in Formalin nachfixiert. Dann erfolgte eine Spülung in PBS mit 0.1%igem Na-Acid.

### **3.17.2 Erstellen von Vibratomschnitten zur Volumenbestimmung**

Nachdem die Gehirne über 24 Stunden nachfixiert und für mindestens eine Stunde in PBS gespült waren, wurde das Kleinhirn vom Großhirn mittels einer Rasierklinge abgesetzt. Zur Herstellung des Einbettmediums wurde 4%iger Agar und 1xPBS verwendet. Eingebettet wurde in kleinen Plexiglas-Kästchen. Der Agar wurde mittels Plastikpipette in die Formen gebracht, dann wurde das Präparat aus dem PBS-Bad genommen und kurz getrocknet. Es wurde dann in den noch flüssigen und warmen Agar gelegt und untergetaucht. Dann wurde das Präparat kurz auf einen eisgekühlten Metallblock gestellt, bevor es für fünf Minuten im Gefrierschrank abgekühlt wurde.

Das Agarblöckchen konnte schließlich im Vibratom in einer Dicke von 60 µm respektive 70 µm geschnitten werden. Die Schnitte wurden dann vom überschüssigen Agar befreit und auf vorbereitete Objektträger gelegt. Es folgte eine ein bis zweistündige Lufttrocknung und dann die Kernfärbung in Kresylviolett nach Laborprotokoll.

### **3.17.3 Volumenberechnung**

Für die elektronische Tumervolumenberechnung wurden Vibratomschnitte zwischen 60 und 70 µm verwendet. Die Tumorschnitte wurde mit einer Digitalkamera (Leica DC 1000) fotografiert, anschließend wurden mit einer Software (Leica) die Schnittflächen ausgemessen. Daraus wurde mit einer Tabellenkalkulationssoftware (Excel, Microsoft) das Tumervolumen berechnet.

## **3.18 RNase Protection Assay (RPA)**

### **3.18.1 RNA-Quantifizierung durch RNase Protection Assay**

Die immunologischen Reaktionen dieses Tumormodells wurden auch auf RNA-Ebene mit Hilfe der RNase Protection Assay (RPA) untersucht. Mit Hilfe eines RPA konnte man sehr geringe Mengen RNA im Gewebe semiquantitativ nachweisen. Dazu wurde ein Überschuss radioaktiv markierter Einzelstrang-RNA als Antisense-Sonde benutzt. Die Bindung der Sonde an die komplementäre Ziel-mRNA führte zur

Bildung stabiler doppelsträngiger RNA-RNA-Hybride. Mit Hilfe spezifischer RNasen (T1 und RNase A) wurde die gesamte nicht-hybridisierte Einzelstrang RNA verdaut. Die verbliebenen RNA-RNA-Hybride wurden denaturiert und in einem Polyacrylamid-gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die radioaktiv markierten RNA-Einzelstrang-Sonden, die der Ziel-mRNA entsprechen, wurden anschließend autoradiographisch auf einem Röntgenfilm dargestellt und beurteilt. Ein RPA hatte gegenüber anderen RNA-Nachweismethoden große Vorteile: Er war hochspezifisch, erforderte den Einsatz nur sehr geringer Ziel-mRNA-Mengen und war leicht quantifizierbar. Außerdem konnte durch die Verwendung verschiedener, unterschiedlich langer Sonden gleichzeitig die mRNA-Expression mehrerer Gene untersucht werden.

### 3.18.2 Herstellung einer Sonde

In diesem Versuch wurden verschiedene Sonden-Sätze verwendet, die teils in unserem Labor selbst hergestellt wurden. Diese Multi-Sonden-Sätze (Tabelle 7) konnten mit Hilfe von einfachen molekularbiologischen Routine-Techniken hergestellt werden.

Probeset ML-11		Probeset ML-26		Probeset MV-1	
RNA-Sonden	Länge(bp)	RNA-Sonden	Länge(bp)	RNA-Sonden	Länge(bp)
TNF-β	323	IL-3	345	ICAM-1	300
TNF-α	303	IL-10	319	nNos	
IL-4	279	GM-CSF	292	iNos	275
IL-5	252	TGF-β1	265	Mac-1	250
IL-1α	229	IL-13	199	eNos	
IFN-γ	206	IL-12 p40	173	EB 22/5	175
IL-2		IL-12 p35	162	GFAP	126
IL-6	184	IL-7	110	RPL 32	78
IL-1β	142	RPL 32	78		
IL-3	129				
RPL32	78				

**Tab. 7** Multi-Sonden-Sätze für RPA

### 3.18.3 Synthese des radioaktiv markierten Sonden-Satzes

In ein Reaktionsgefäß wurden nacheinander pipettiert: 7,3 µl 10 µM UTP, 1,1 µl rGTP, rCTP, rATP (jeweils 2,5mM) und 12 µl (32P) UTP (300Ci/mmol; 10 mCi/ml). Dieses Gemisch wurde im Vakuumkonzentrator bei RT für 45 Min. getrocknet. Dann

wurden zur Synthese der radioaktiv markierten Antisense-RNA-Sonden folgende Substanzen hinzugefügt:

	[ $\mu$ l]	Endkonzentration	Hersteller
H <sub>2</sub> O	5,0		
Transkriptionspuffer (5x)	2,0	1x	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
DTT (100 mM)	1,0	10 mM	Promega, Madison, WI, USA
RNAse-Inhibitor (40 U/ml)	0,5	2U/ $\mu$ l	Pharmacia, Uppsala, Schweden
T7 RNA-Polymerase (15U/ $\mu$ l)	0,5	0,75 U/ $\mu$ l	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
DNA-Matrize (Eco-R1- linearisiert)	1,0	15 ng/Ansatz	

**Tab. 8** radioaktiv markierter Sondensatz

Der Transkriptionsansatz wurde gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zum Verdau der DNA-Matrize wurde nach folgendem Schema pipettiert:

	[ $\mu$ l]	Endkonzentration	Hersteller
TE	16,0	1x	
Transkriptionspuffer (5x)	2,0	0,06 U/ $\mu$ l	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Dnase I (2 U/ $\mu$ l)	1,0		Pharmacia, Uppsala, Schweden

**Tab. 9** Transkriptionsansatz

Der Ansatz wurde kurz gemischt, zehn Sek. zentrifugiert und für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Um die RNA-Sonden zu reinigen, wurden 29  $\mu$ l EDTA (20 mM; pH 8,0) und 70  $\mu$ l Phenol-Chloroform hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz bei RT mit 16.000 g zentrifugiert, die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der Sonden 60  $\mu$ l Ammoniumacetat (4M), 600  $\mu$ l 100% Ethanol und 5  $\mu$ l tRNA (10 mg/ml) dazu pipettiert. Nach dem Mischen und 15 Min. Inkubation auf Trockeneis folgte eine Zentrifugation für 30 Min. bei 4°C mit 16.000 g. Das Pellet wurde mit 100  $\mu$ l 80% Ethanol gewaschen und für 10 Min. bei 16.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einem Vakuumkonzentrator bei RT für ca. 10 Min. getrocknet, danach in 20  $\mu$ l Hybridisierungspuffer resuspendiert und 1  $\mu$ l der Lösung mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus, Roth, Karlsruhe) vermischt. Dann folgte die Messung der Aktivität dieser verdünnten Sonde (in DPM: Disintegration per Minute) in einem Szintillationsanalysator (Packard, Waldbronn). Die Probe wurde so verdünnt, dass die Aktivität 100 DPM/ $\mu$ l pro UTP-Rest im Sondenmix aufwies:

Sondensatz	Verdünnung (DPM/10µl)
ML-11	$5 \times 10^4$
ML-26	$5 \times 10^4$
MV-1	$4 \times 10^4$

**Tab. 10** Verdünnung der Sondensätze

### 3.18.4 Hybridisierung

Von jeder gesamt-RNA-Probe wurden 3 µg in ein Reaktionsgefäß pipettiert und ein leeres Reaktionsgefäß ohne RNA als Negativkontrolle vorbereitet. Dann wurden 10 µl der verdünnten, radioaktiv markierten Sonde und ein Tropfen Mineralöl hinzugegeben. Nach Mischen und zehn Sek. zentrifugieren wurden die RNA-Proben bei 95°C denaturiert und anschließend über Nacht bei 56°C hybridisiert.

### 3.18.5 RNase-Behandlung

Am nächsten Tag wurde zum Verdau der nicht-hybridisierten Einzelstrang-RNA 100 µl RNase-Puffer hinzugefügt, gemischt, kurz zentrifugiert und für 45 Min. bei 32°C inkubiert.

### 3.18.6 Gießen des Elektrophorese-Gels

Während des RNase-Verdau wurden die Glasplatten der Gelkammer (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) vorbereitet, das Gel angemischt (0,6% Ammoniumpersulfat (10%); 0,08% TEMED in 5% Acrylamid) und gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde es in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und mit 50 Watt für 1h vorgewärmt.

### 3.18.7 Reinigung und Präzipitation

Anschließend wurde 150 µl Phenol-Chloroform hinzugefügt, kräftig gemischt und für 5 Min. bei RT mit 16.000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 60 µl Ammoniumacetat (4M), 600 µl 100% Ethanol und 10 µl tRNA (10 mg/ml) dazu pipettiert. Die Proben wurden kräftig von Hand geschüttelt, für 20 Min. auf Trockeneis gefällt und für 30 Min. bei 4°C mit 16.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 150 µl 80% Ethanol vorsichtig gewaschen, für 10 Min. bei 4°C mit 16.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde es im Vakuumkonzentrator bei RT etwa 15 Min. getrocknet und in 4 µl Ladepuffer resuspendiert. Zur Trennung der RNA-Doppelstränge wurden die Proben



für 3 Min. bei 95°C in den Heizblock gestellt und bis zur Auftragung auf das Gel auf Eis gekühlt.

### **3.18.8 Gelelektrophorese**

Als Längenstandard wurde der radioaktiv markierte SONDENSATZ auf 5000 DPM/ $\mu$ l verdünnt, zusammen mit den Proben in die Geltaschen geladen und die Sonden bei 60 Watt aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf einem Whatman-Filterpapier (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) aufgezogen und die Oberseite auf Zellophanfolie beschichtet. Das Gel wurde dann in einem Geltrockenapparat (Biorad, USA) für ca. 30 Min bei 80°C getrocknet.

## **3.19 Zelluläre Immunologie**

### **3.19.1 Depletionsexperimente**

Um die Rolle der einzelnen T-Zellen-Subpopulationen näher zu untersuchen, wurden die CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen depletiert. Vier GF-IL12 tg Tiere erhielten 200  $\mu$ l anti-CD4 mAB i. p. in einer Verdünnung von 1:3 einen Tag vor und einen Tag nach der Tumorimplantation. Sechs GF-IL12 tg Tiere erhielten 200  $\mu$ l anti-CD8 mAB i. p. in einer Verdünnung von 1:3 einen Tag vor und einen Tag nach der Operation. Der Erfolg dieser Depletion wurde in einer FACS-Analyse eine und zwei Wochen nach Implantation überprüft. Nach drei Wochen wurde wieder analog zu den bisherigen Versuchen (siehe Abschnitt 3.17) das Tumolvolumen für folgende Gruppen bestimmt: GF-IL12, GF-IL12 CD8 depletiert, GF-IL12 CD4 depletiert und Wt.

### **3.19.2 CRAG-Versuchstiere**

In dieser Versuchsreihe wurden Tiere untersucht, welche ebenfalls das IL-12 transgen exprimierten und eine homozygote Disruption des RAG2-Gens aufwiesen. Diese Versuchstiere hatten weder reife T- noch B-Lymphozyten, NK-Zellen waren jedoch weiterhin vorhanden. Die Rolle der NK-Zellen sollte bei diesem Experiment näher untersucht werden.

### **3.19.3. IFN-gamma K.O. Mäuse (IC-Tiere)**

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Wirkungen von INF-gamma untersucht. Dazu wurden jeweils sechs GF-IL12 transgene Mäuse mit einer homozygoten Disruption des IFN-gamma Gens und sechs Wt IFN-gamma-K.O.-Mäuse operiert. Die Versuchstiere wurden nach drei Wochen seziert und die Tumervolumenbestimmung wurde wieder mittels Vibratomschnitten durchgeführt. (siehe Abschnitt 3.17)

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Etablierung des Tumormodells

Für eine erfolgreiche Tumorimplantation war entscheidend, dass die Versuchstiere korrekt in der Stereotaxieeinheit eingespannt und gelagert wurden und die Zielkoordinaten richtig berechnet wurden. Die Grundeinstellungen für die Koordinaten wurden aus dem Stereotaxie-Atlas von A. Lehmann entnommen und mussten an das C57BL/6 Mausmodell angepasst werden. (53)

Zunächst wurden Tumorzellen in das Corpus striatum implantiert, und nach unterschiedlichen Wartezeiten (zwei oder drei Wochen) wurden die Gehirne histologisch auf eine Tumorneubildung untersucht. Im Rahmen dieses Vorversuches wurden verschiedene Parameter beobachtet, die für eine Tumorneubildung wichtig waren. Dazu gehörte die Etablierung der Injektionszeit, die Tumorzellanzahl und die Zeit bis zur Entwicklung von makroskopischen Tumoren. Als das Modell für einen striatalen Tumor etabliert war, konnten die technisch schwierigeren Implantationen auf das Cerebellum unternommen werden. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die etablierten Koordinaten. Der Ursprung für x und y entsprach der Kreuzung der Lambda- mit der Sagitalnaht. Der Nullpunkt für die z-Achse liegt auf Höhe der Dura mater.

#### 4.1.1 Koordinaten Operationszeiten des Tumormodell

	Cerebellum	Striatum
x-Achse [mm]	1.00	1.00
y-Achse [mm]	2.50	2.00
z-Achse [mm]	2.50	2.00

Tab. 11 zeigt die Zielkoordinaten für die Zielstrukturen im Cerebrum. Mit der Stereotaxieeinheit von Kopf® Instruments war es möglich, im 1/10 mm-Bereich zu arbeiten.

Nachdem die richtigen Koordinaten korrekt auf das Kleinhirnmark der rechten Hemisphäre eingestellt waren, gelang es noch nicht, Tumoren mit einer injizierten Zellzahl von  $3 \times 10^4/3 \mu\text{l}$  reproduktiv zu erzeugen. Als entscheidende Einflussgröße stellte sich nach weiteren Implantationen die Operationszeit heraus. Zu Beginn der Versuche wurde die Stereotaxienadel zwei Minuten nach Zellapplikation im OP-Gebiet belassen. In den histologischen Kontrollen nach zwei und drei Wochen fand sich kein Tumorgewebe im Bereich des Stichkanals. Meist stellten sich nur eine reaktive Gliose und Entzündungszellen dar. Aufgrund dieses Problems wurden die Injektions- und Wartezeiten verlängert (siehe Tabelle 12), damit war das Tumormodell etabliert.

	Vor Etablierung	Nach Etablierung
Injektionszeit [Min]	1.00	5.00
Wartezeit bis Entnahme [Min]	1.00	10.00
Entnahmezeit der Kanüle [Min]	1.00	5.00
Gesamtzeit [Min]	3.50	20.50
Ergebnis → Tumor?	Nein	Ja

**Tab. 12** gibt eine Übersicht über die OP-Zeiten. Mit den OP-Zeiten nach Etablierung konnte bei jeder Injektion ein Tumor erzeugt werden.

## 4.2 Klinischer Verlauf bei den Versuchstieren C57BL/6

In der ersten Versuchsreihe wurden 21 Tiere (GF-IL12 n=8; Wt n=13) operiert und nach vier Wochen seziert. Wenn die Versuchstiere vorzeitig symptomatisch wurden, wurden sie früher seziert. In den ersten 14 Tagen postoperativ blieben sowohl die Wildtyp als auch die GF-IL12 tg Tiere symptomfrei. Allerdings verstarb ein Wt-Tier am dritten postoperativen Tag und wurde damit aus dem Experiment genommen. Die Sektion zeigte ein hämorrhagisches Cerebrum. Nach durchschnittlich 14 bis 16 Tagen entwickelten die Wt-Tiere Symptome, zunächst eine Ataxie und eine Retardierung. Später traten dann Koordinationsstörungen und Gleichgewichtsstörungen auf. Die Wt-Tiere fielen häufiger vom Käfigrand herunter als Ihre GF-IL12 transgenen Geschwistertiere.

Die GF-IL12 Mäuse (n=8) entwickelten bis zum Sektionstermin am 25. bis 28. Tag eine durchweg mildere Symptomatik. Zum Teil hatten sie gar keine klinischen Symptome. So gab es in dieser Gruppe keine Paresen. Vier Tiere (50%) zeigten eine Ataxie. Diese vier Tiere hatten auch die größten Tumore (42,47 mm<sup>3</sup>; 28,30 mm<sup>3</sup>; 22,33 mm<sup>3</sup>; 16,71 mm<sup>3</sup>). Zudem zeigten zwei Tiere (25%) eine Verlangsamung und vier Tiere (50%) eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes, verbunden mit einer geringen Gewichtsabnahme. Vier Tiere in dieser Gruppe (50%) zeigten keine Symptome bis zum Sektionstag.

In der Gruppe der Wildtypiere (n=13) entwickelten neun Tiere (69,23%) eine Verlangsamung und eine Ataxie. Vier Tiere (30,76%) entwickelten eine Parese und im weiteren Verlauf auch eine schwere Gangstörung (Hinterherziehen einer Extremität). Bei allen Tieren beobachtete man eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes, oft verbunden mit einer Kachexie. Ein Tier (7,69%) hatte keine Symptome. Der Tumor dieses Tieres hatte ein Volumen von 36,52 mm<sup>3</sup> und lag damit unter dem Mittelwert (44,41 mm<sup>3</sup>) aller Tumorumfänge.

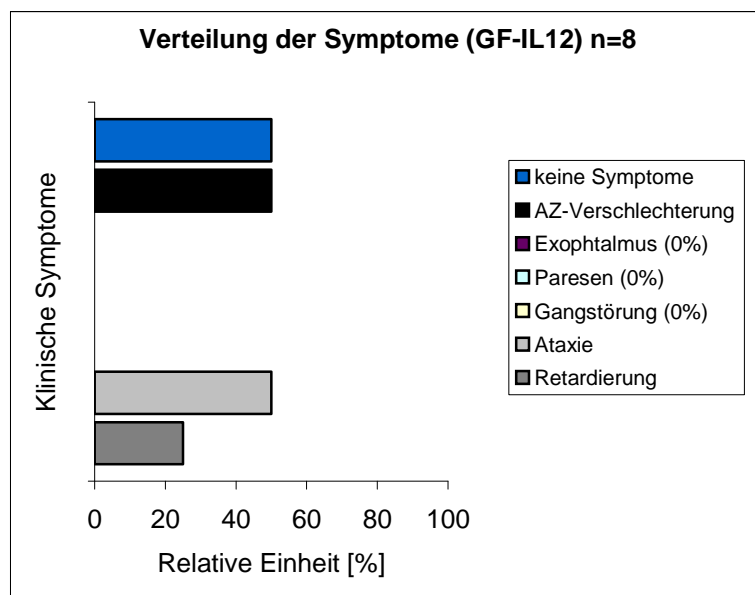
Es gab noch weitere sechs Wt-Tiere (46%) mit unterdurchschnittlich großen Tumoren ( $29,52 \text{ mm}^3$ ;  $35,56 \text{ mm}^3$ ;  $29,72 \text{ mm}^3$ ;  $34,51 \text{ mm}^3$ ;  $18,39 \text{ mm}^3$ ,  $22,46 \text{ mm}^3$ ), die alle eine ausgeprägte Symptomatik hatten. Tabelle 13, Abbildung 1a und 1b geben einen Überblick über die Symptomverteilung in den beiden Untersuchungsgruppen. Abschnitt 4.2.2 gibt einen Symptomscore mit den jeweiligen Durchschnittswerten für die Wt und GF-IL12 transgenen Versuchstiere an.

#### 4.2.1 Übersicht der klinischen Symptome am Sektionstag (4 Wochen)

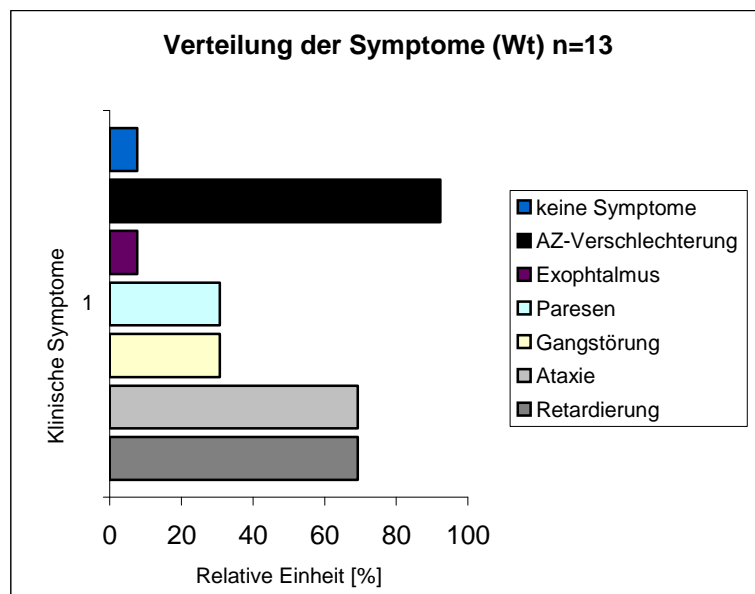
	Tiere (n)	Retardierung	Ataxie	Gangstörung	Paresen	Exophthalmus	AZ-Minderung	Keine Symptome
<b>GF-IL12 tg</b>	8	2	4	0	0	0	4	4
<b>Relativ</b>	100%	25.00%	50.00%	0.00%	0.00%	0.00%	50.00%	50.00%

<b>Wt</b>	13	9	9	4	4	1	12	1
<b>Relativ</b>	100%	69.23%	69.23%	30.77%	30.77%	7.69%	92.31%	7.69%

**Tab. 13** zeigt die Symptome der Versuchstiere am Sektionstag (Tag 25-28 postop). GF-IL 12 tg (n=8) und Wt (n=13). Nur ein Wt-Tiere hatte am Sektionstag keine Symptome, wobei dieses Tier mit einem Tumolvolumen von  $36,52 \text{ mm}^3$  einen großen Befund hatte.



**Abb. 1 a** zeigt die Symptomverteilung in der Gruppe der GF-IL12 transgenen Tiere. Beachte besonders den großen Anteil an Tieren ohne klinische Symptome am Sektionstag und das Fehlen von Paresen und Gangstörung. Zudem bestand in dieser Gruppe keine Tumorkachexie.



**Abb. 1 b** zeigt die Symptomverteilung in der Gruppe der Wildtyp-tiere. Diese Tiere hatten häufiger Symptome am Sektionstag und schwere Symptome als die Tiere der GF-IL12 Gruppe. 30% der Tiere hatten am Sektionstag bereits eine Parese.

#### 4.2.2 Klinischer Verlauf - Scoring

1	2	3	4	5
Keine klinischen Symptome. Tier verhält sich wie unbehandeltes Geschwistertier gleichen Alters und Geschlecht.	Milde Zeichen einer Ataxie und milder Gewichtsverlust < 5% über 4 Wochen. Keine Lähmungszeichen.	Deutliche Reduktion des Allgemeinzustandes bei herabgesetzter motorischer Aktivität und deutlichen Zeichen einer Ataxie. Tumorkachexie.	Sehr schlechter Allgemeinzustand. Beeinträchtigung der motorischen Aktivität durch Paresen. Signifikante Tumorkachexie > 10 % in 4 Wochen.	Massivste Paresen und Kachexie. Tier ist in seiner Aktivität massivst eingeschränkt. In diesem Zustand wurden Tiere sofort seziert. Z.T. schon nach 25 Tagen.

GF-IL12

WT

Aufgrund des klinischen Verlaufes mit unterschiedlicher Symptomatik und des Gewichtsverlaufes konnte ein klinischer Score aufgestellt werden, der den Zustand des Tieres beschrieb. Im Durchschnitt lag der Score für die GF-IL-12 transgenen Tiere bei 1,5 (Standardabweichung: 0,50) und für die Wt-Tiere bei 3,3. (Standardabweichung: 1,32)

#### **4.2.3 Postoperativer Gewichtsverlauf 14 Tage nach Tumorimplantation**

Bei acht Tieren (Wt n=6, GF-IL-12 tg n=2) wurde das Körpergewicht zwei Wochen nach Tumorimplantation bis zum Sektionsdatum gemessen. In der Wt-Gruppe hatten fünf von sechs Tieren einen deutlichen Gewichtsverlust zu verzeichnen. (83,33%) Im Durchschnitt verloren die Tiere 2,52 g ihres Körpergewichtes (10,87%). Das Versuchstier mit dem größten Gewichtsverlust von 24% hatte den größten Tumor mit einem Volumen 86,69 mm<sup>3</sup>. Dieses Versuchstier hatte auch eine ausgeprägte klinische Symptomatik mit AZ-Verschlechterung, Hemiparese mit Gangstörung, Ataxie. Dies ergab einen Symptomscore von fünf.

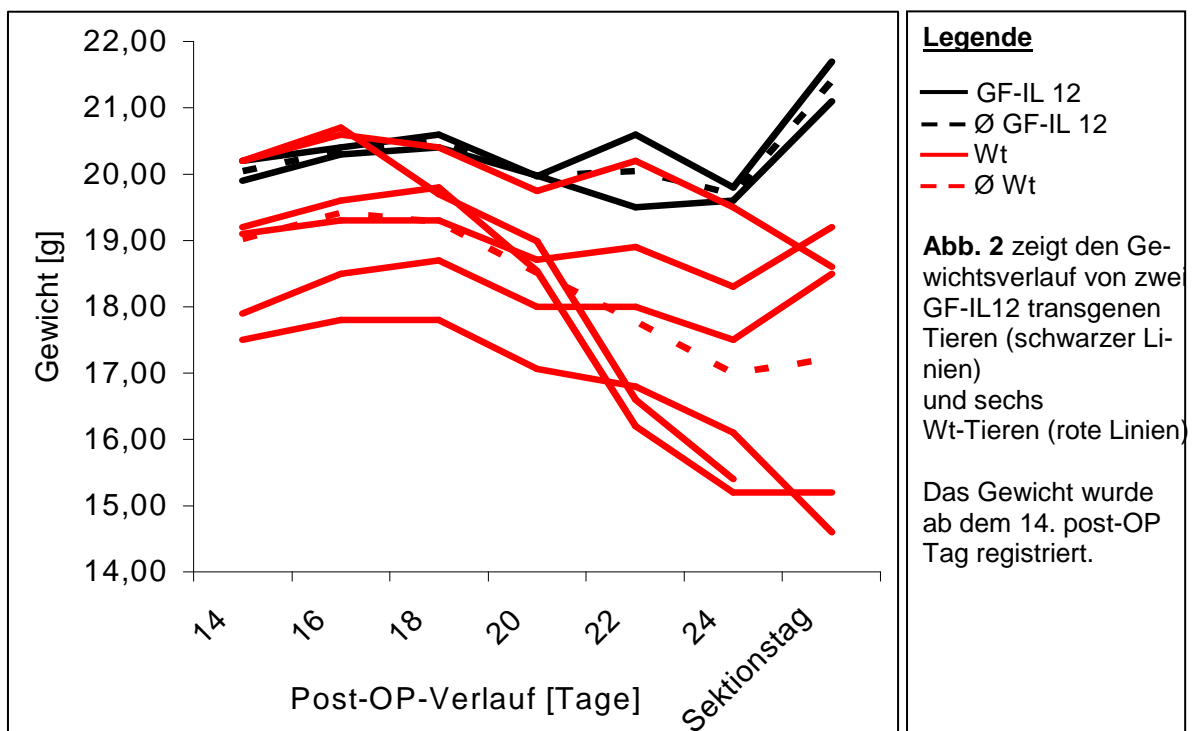
Das Tier mit dem geringsten Gewichtsverlust in der Wt-Gruppe hatte den zweitkleinsten Tumor mit 22,46 mm<sup>3</sup>. Allerdings hatte es bereits einen Symptomscore von drei. Das Versuchstier mit dem kleinsten Tumolvolumen von 18,39 mm<sup>3</sup> gewann über den Beobachtungszeitraum um 0,5% an Gewicht. An Symptomen hatte dieses Tier lediglich eine Ataxie.

Beide GF-IL12 tg Tiere zeigten eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 1,35 g (6,73%) und waren klinisch unauffällig.

#### 4.2.4 Postoperativer Gewichtsverlauf ab Tag 14

Post-OP-Tag	#105 GF- IL12	#106 GF- IL12	Mittel GF- IL12	# 107 Wt	# 108 Wt	#89 Wt	#111 Wt	# 109 Wt	# 110 Wt	Mittel Wt
14	19,90	20,20	<b>20,05</b>	20,20	19,10	19,20	20,20	17,90	17,50	<b>19,02</b>
16	20,30	20,40	<b>20,35</b>	20,60	19,30	19,60	20,70	18,50	17,80	<b>19,42</b>
18	20,40	20,60	<b>20,50</b>	20,40	19,30	19,80	19,70	18,70	17,80	<b>19,28</b>
20	19,98	19,97	<b>19,98</b>	19,75	18,71	18,54	18,99	18,00	17,06	<b>18,51</b>
22	19,50	20,60	<b>20,05</b>	20,20	18,90	16,20	16,60	18,00	16,80	<b>17,78</b>
24	19,60	19,80	<b>19,70</b>	19,50	18,30	15,20	15,40	17,50	16,10	<b>17,00</b>
Sektionstag	21,10	21,70	<b>21,40</b>	18,60	19,20	15,20		18,50	14,60	<b>17,22</b>
Verlust/ Gewinn [g]	<b>1,20</b>	<b>1,50</b>	<b>1,35</b>	<b>-1,60</b>	<b>0,10</b>	<b>-4,00</b>	<b>-4,80</b>	<b>0,60</b>	<b>-2,90</b>	<b>-2,52</b>
Relativ [%]	<b>6,03</b>	<b>7,43</b>	<b>6,73</b>	<b>-7,92</b>	<b>0,52</b>	<b>-20,83</b>	<b>-23,76</b>	<b>3,35</b>	<b>-16,57</b>	<b>-10,87</b>
Tumorgröße [mm <sup>3</sup> ]	0,75	0,55	0,65	50,02	18,39	66,53	86,69	22,46	42,32	47,74

**Tab. 14** zeigt den Gewichtsverlauf von zwei GF-IL12 transgenen Tieren und sechs Wt-Tieren. Es zeigte sich ein signifikanter Gewichtsverlust in der Wt-Gruppe. In der GF-IL12 Gruppe gab es dagegen bei allen Versuchstieren einen Gewichtszuwachs.



#### 4.2.5 Postoperativer Gewichtsverlauf direkt nach Tumorumplantation

In einer zweiten Versuchsreihe wurde das Gewicht von GF-IL12 tg Tieren (n=3) und Wt-Tieren (n=2) ab dem Operationstag gemessen. In beiden Gruppen kam es in den ersten drei Wochen nach Tumorumplantation zu einer konstanten Gewichtszunahme. Dabei nahmen die Wt-Tiere durchschnittlich 8% und die GF-IL12 tg Tiere durch-

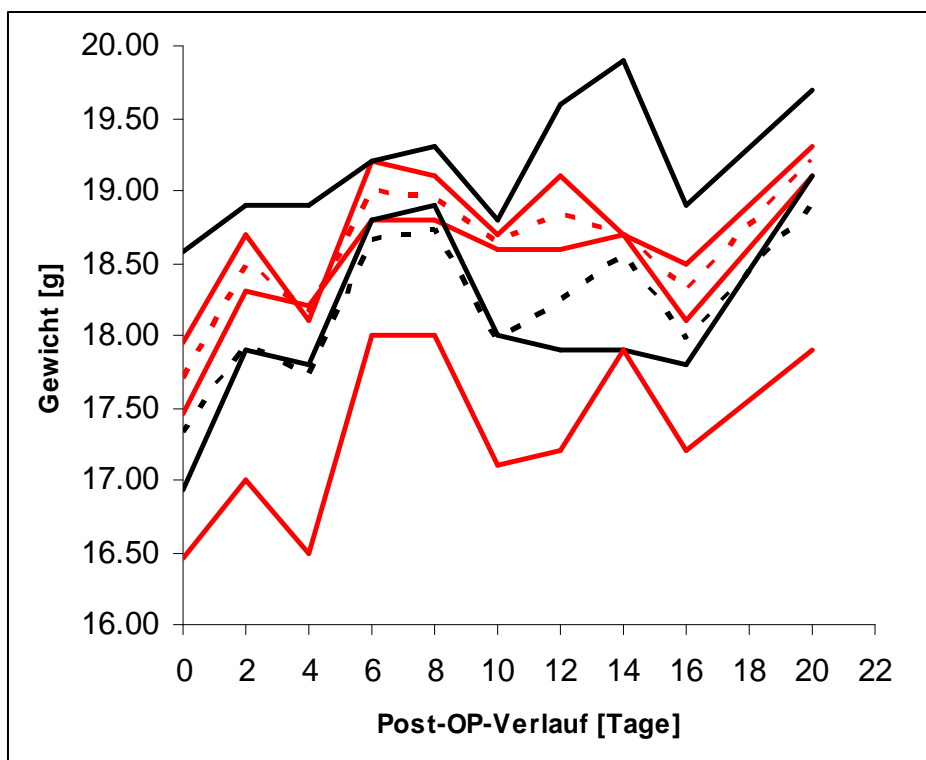


schnittlich 9% an Gewicht zu. Tabelle 15 und Abbildung 3 geben einen Überblick über die Verläufe.

#### 4.2.6 Postoperativer Gewichtsverlauf ab Operationstag

Post-OP-Tag	#112 Wt	#114 Wt	Mittelwert Wt	#115 GF-IL12	#120 GF-IL12	#113 GF-IL12	Mittelwert GF-IL12
0	17,45	17,95	<b>17,70</b>	16,94	16,45	18,57	<b>17,32</b>
2	18,30	18,70	<b>18,50</b>	17,90	17,00	18,90	<b>17,93</b>
4	18,20	18,10	<b>18,15</b>	17,80	16,50	18,90	<b>17,73</b>
6	18,80	19,20	<b>19,00</b>	18,80	18,00	19,20	<b>18,67</b>
8	18,80	19,10	<b>18,95</b>	18,90	18,00	19,30	<b>18,73</b>
10	18,60	18,70	<b>18,65</b>	18,00	17,10	18,80	<b>17,97</b>
12	18,60	19,10	<b>18,85</b>	17,90	17,20	19,60	<b>18,23</b>
14	18,70	18,70	<b>18,70</b>	17,90	17,90	19,90	<b>18,57</b>
16	18,50	18,10	<b>18,30</b>	17,80	17,20	18,90	<b>17,97</b>
20	19,30	19,10	<b>19,20</b>	19,10	17,90	19,70	<b>18,90</b>
Zunahme [g]	<b>1,85</b>	<b>1,15</b>	<b>1,50</b>	<b>2,16</b>	<b>1,45</b>	<b>1,13</b>	<b>1,58</b>
Relativ [%]	<b>11%</b>	<b>6%</b>	<b>8%</b>	<b>13%</b>	<b>9%</b>	<b>6%</b>	<b>9%</b>
Symptoms- core	Nicht bestimmt	2	-	1	1	1	-
Tumor Volu- men [mm <sup>3</sup> ]	Makro*	48,21	-	0,5	Kein Makro*	15,25	-

**Tab. 15** zeigen die Gewichtsverläufe bei GF-IL12 tg und Wt-Tieren direkt nach der Tumorimplantation bis zum 20. post-OP-Tag. In beiden Gruppen kam es zu einer Gewichtszunahme in den ersten 20 Tagen nach OP. \*Makro = Makroskopisch deutlich nachweisbarer Tumor, dessen Volumen, jedoch nicht vermessen wurde, weil das Gewebe für andere Experimente gebraucht wurde.



**Abb. 3** zeigt die Gewichtsverläufe bei GF-IL12 tg und Wt-Tieren direkt nach der Tumorimplantation bis zum 20. post-OP-Tag. In beiden Gruppen kam zu einer Gewichtszunahme über die Beobachtungszeit. Legende siehe Abb. 2

### **4.3 Histologische Befunde der implantierten Tumoren**

Mikroskopisch waren folgende Tumormerkmale auffällig:

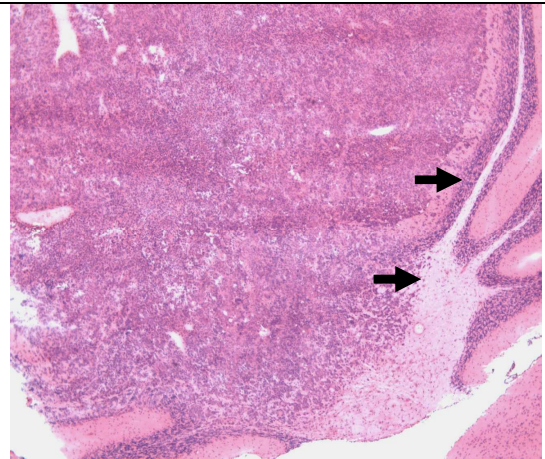
- Verdrängendes, wenig infiltrierendes Wachstum.
- Die Tumore hatten eine scharfe Begrenzung zum gesunden Gewebe.
- Vereinzelt konnten im Randbereich auch infiltrierende Tumorzellen gesehen werden.
- Vier Wochen nach Implantation hatten die Tumore häufig das gesamte Kleinhirn erfasst und immer die kontralaterale Hemisphäre erreicht.
- Das histologische Bild war bunt mit einer ausgeprägten Kernpolymorphie und Pleomorphie. Die Kern-Plasma-Relation war zu Gunsten der Kerne verschoben. Es waren atypische Mitosefiguren zu sehen, die meist peripher lagen.
- Vereinzelt war ein pseudorosettenhaftes Wachstum zu erkennen.
- Deutliche Nekroseherde mit apoptotischen Zelltrümmern waren drei Wochen nach Implantation nachzuweisen.
- Es traten häufiger Blutungen auf, die durch massive Erythrozyteninfiltrate charakterisiert wurden.
- Bereits im H.E. Schnitt gab es Hinweise auf eine Neovaskularisation, wie schon der makroskopische Befund vermuten ließ.

Nach 25 Tagen erreichte der Tumor meist die Schädelkalotte. Zum Teil wurden in den Wt- und den CRAG-Tieren deutliche Knochendestruktionen gefunden.

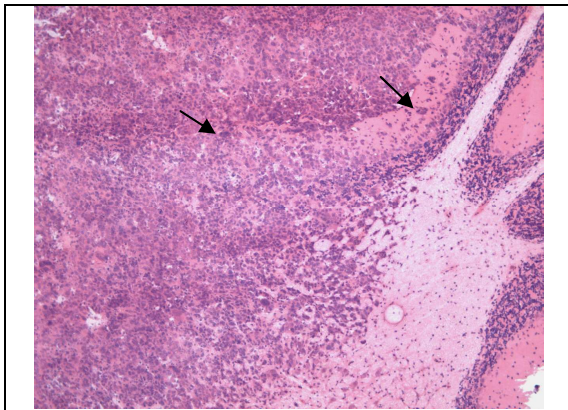
#### 4.3.1 H.E. Histologie des cerebellären Tumors GL 261 (Wt-Tier)



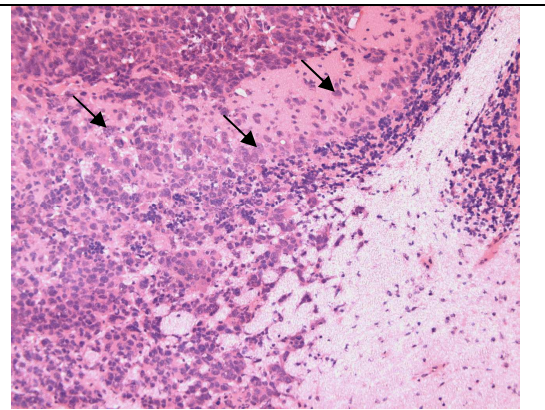
**Abb. 4 a** zeigt einen sagitalen H.E. Schnitt 12  $\mu$ m durch ein tumorinfiltriertes Kleinhirn (schwarze Punktlinie) einer Wildtyp-Maus nach 3 Wochen Tumorstadium. Nahe der Medialen Ebene. Der Tumor hat nahezu das gesamte Kleinhirn verdrängt. Vergrößerung 1,6x



**Abb. 4 b** zeigt eine 5x Vergrößerung des Schnittes aus Abb. 4 a. Beachte die normale Kleinhirnstruktur (Pfeil) und im Vergleich dazu das Tumorgewebe, welches z. T. deutliche Einrisse zeigt, teilweise durch eine Tumornekrose.



**Abb. 4 c** zeigt eine 10x Vergrößerung von Abb. 4 a. Beachte einzelne Infiltrationen von Tumorzellen vom Tumor weg, hin zur Körnerzellschicht (Pfeile). Beachte hierzu auch die größeren Vergrößerungen Abb. 4 d



**Abb. 4 d** zeigt eine 20x Vergrößerung von Abb. 4 a. Hier kann man nochmals die Grenzen des Tumors genau verfolgen. Man sieht nur eine geringe Infiltrationstendenz. Die Pfeile zeigen nochmals einzeln verteilte Tumorzellen.

#### **4.4 Immunohistologische Darstellung**

Um den Tumor und die Entzündungsreaktionen im ZNS zu charakterisieren, wurden 12 µm dicke Schnitte für die Immunohistochemie angefertigt. Folgende Antigene wurden näher untersucht: CD4, CD8, CD45R, CD31, Mac-1, GFAP, CD 31, Ki-67, S100.

##### **4.4.1 KI-67**

Bei einer Verdünnung von 1:50 ergab sich für KI-67 eine hohe Anfärberate, nahezu 100% der Tumorzellen zeigten eine Proliferationsbereitschaft. In den GF-IL12 tg Tieren waren die Tumorzellen weniger dicht gepackt respektive schon zerstört und abgeräumt, so dass sich dort eine geringere Anfärbung für KI-67 ergab.

##### **4.4.2 GFAP**

Bereits nach stereotaktischer Punktion ohne Zell-Applikation konnte das saure Gliafaserprotein (GFAP) vermehrt in der Immunohistochemie nachgewiesen werden. Die Tumorzellen selbst bildeten kein GFAP. Die Anfärberate in den Wt- und GF-IL12 tg Tieren mit einer Tumorimplantation war vergleichbar.

##### **4.4.3 S100 Protein**

Die Proteine der Multigen-Familie S-100 sind Kalzium-bindende Proteine mit niedrigem Molekulargewicht und einer Vielzahl von zellulären Funktionen. S100 wird in der Histopathologie als Proteinmarker verwendet. Es gibt typische S100-positive Tumoren, wie beispielsweise chondroide Tumoren, Gliome, Nervenscheidentumoren oder Melanome. Der Tumor GL261, wie auch das Hirnparenchym, war in der Immunohistochemie unspezifisch positiv für S100 angefärbt.

##### **4.4.4 CD31**

Mit dem Marker CD31, einem Oberflächenantigen von Endothelien, konnten selektiv die Gefäße im Hirngewebe und im Tumor sichtbar gemacht werden. Es zeigte sich, dass die Tumore in den GF-IL12 tg Versuchstieren eine deutlich geringere Gefäßdichte hatten als ihre Wt Geschwistertiere. Eine EDV-gestützte Auswertung zeigte jedoch keine statistische Signifikanz.

#### **4.4.5 CD45 Rezeptor**

Im Tumor und dessen Umgebung wurden CD45 Rezeptor immunoreaktive B-Zellen nur in geringer Dichte oder überhaupt nicht beobachtet.

#### **4.4.6 CD4**

Die CD4+ T Zellen waren sowohl in den Wt- als auch in den GF-IL12 tg Tieren nachzuweisen. In den GF-IL12 tg Tieren waren jedoch mehr CD4+ T-Zellen nachzuweisen. Besonders in der Übergangszone des Tumors konnten die CD4+ T-Zellen deutlich nachgewiesen werden. Im Tumorgewebe waren weniger CD4+ T-Zellen nachweisbar, vereinzelt fanden sie sich im Zentrum des Tumors.

#### **4.4.7 CD8**

In den Wt-Tieren waren die CD8+ T-Zellen nur in sehr geringer Anzahl in der Peripherie des Tumors nachzuweisen. Auch im Verlauf des Tumorwachstums ergab sich kein Anstieg der CD8+ T-Zellen.

Ganz anders sah das Bild in den GF-IL12 tg Tieren aus. Dort war ein signifikanter Anstieg der CD8+ T-Zellen zu verzeichnen, der besonders im Grenzgebiet zwischen Tumor und Hirngewebe zu verzeichnen war. Auch im gesamten Cerebrum, besonders in den Liquorräumen und Meningen, war eine Ansammlung von CD8+ T-Zellen zu verzeichnen.

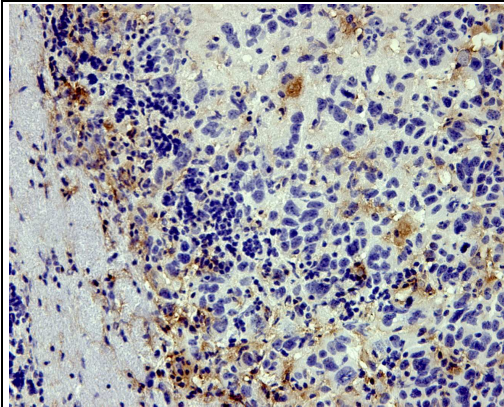
#### **4.4.8 Mac-1**

Der „Membrane Attack Complex -1“ ist ein Bestandteil von Makrophagen. Sowohl in den GF-IL12 tg Tieren als auch in den Wt-Tieren fand sich eine hohe Anfärberate für das Mac-1 Antigen. Signifikante Unterschiede in der Quantität und Qualität der Färbungen fanden sich nicht.



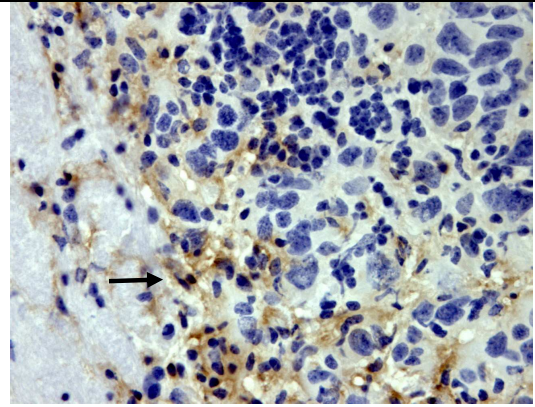
In den folgenden Abbildungen sind die wichtigsten immunologischen Ergebnisse dargestellt.

#### 4.4.9 Immunohistochemie GL261 in Wt und GF-IL12 Tier: MAK-1

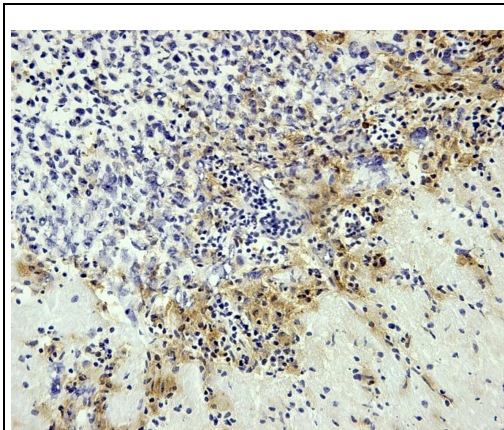


MAK-1  
Wildtyp

**Abb. 5 a** zeigt einen Ausschnitt des GL261 Tumors (x20 vergrößert) bei einem Wt Tier. Der verwendete Antikörper markiert MAK-1 (Membrane Attack Complex 1) ein Bestandteil von Makrophagen.

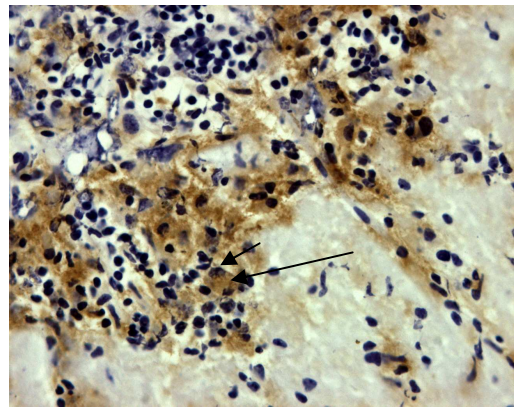


**Abb. 5 b** zeigt eine 40fache Vergrößerung des Schnittes aus Abb. 5a. Die Tumorzellen sind deutlich von Makrophagen (schwarzer Pfeil) umlagert, besonders in den peripheren Tumorteilen.



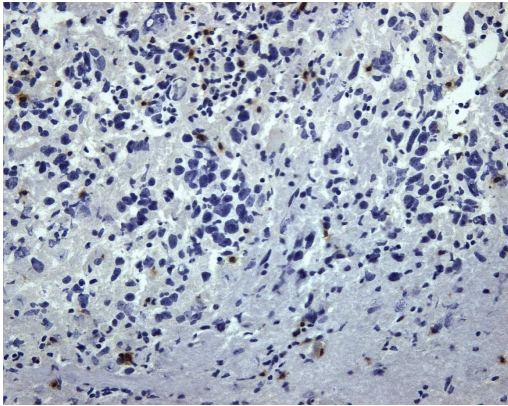
MAK-1  
GF-IL  
12

**Abb. 5 c** zeigt einen Ausschnitt des GL261 Tumors (x20 vergrößert) bei einem Wt Tier. Der verwendete Antikörper markiert MAK-1 (Membrane Attack Complex 1) ein Bestandteil von Makrophagen.



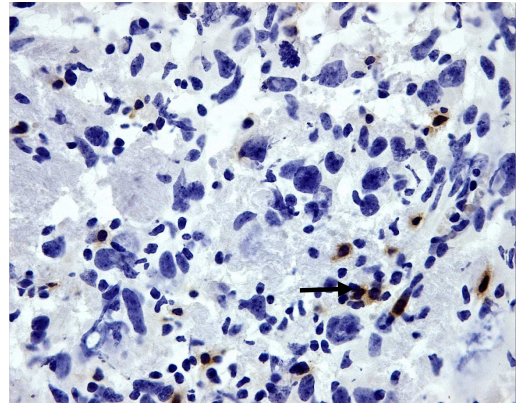
**Abb. 5 d** zeigt eine 40fache Vergrößerung des Schnittes aus Abb. 5 c. Die Tumorzellen (schwarzer Pfeil kurz) sind deutlich von Makrophagen (schwarzer Pfeil lang) umlagert, besonders in den peripheren Tumorteilen.

#### 4.4.10 Immunhistochemie GL261 in Wt und GF-IL12 Tier: CD8

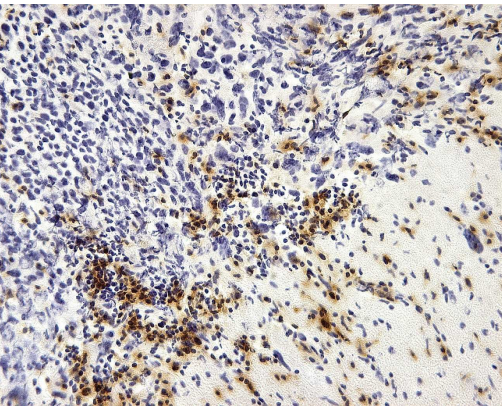


**Abb. 6 a** zeigt einen Ausschnitt des GL261 Tumors (x20 vergrößert) bei einem Wt Tier. Der verwendete Antikörper markiert CD8+ T-Zellen.

CD 8  
Wildtyp

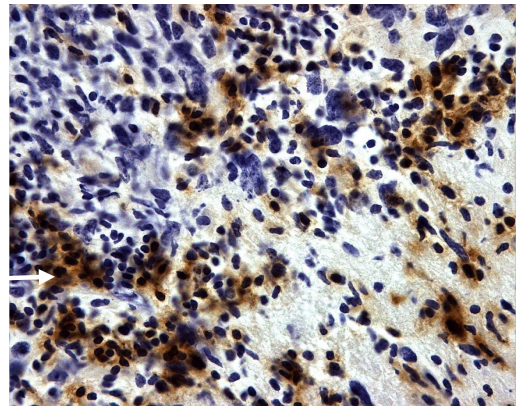


**Abb. 6 a** zeigt eine 40fache Vergrößerung des Schnittes aus Abb. 6 a. Nur vereinzelt sind CD8+ T-Zellen nachweisbar (schwarzer Pfeil)



**Abb. 6 c** zeigt einen Ausschnitt des GL261 Tumors (x20 vergrößert) in einem GF-IL12 Tier. Der verwendete Antikörper markiert CD8+ T-Zellen und ist deutlich positiv.

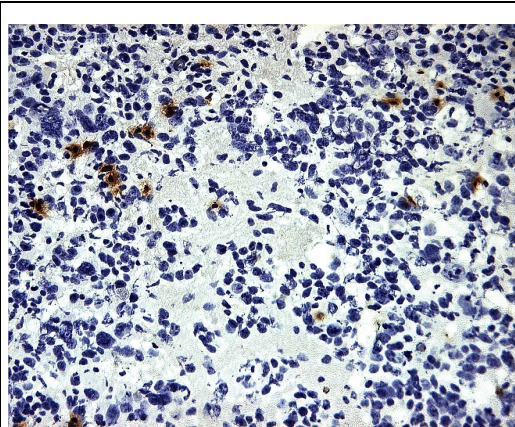
CD 8  
GF-IL 12



**Abb. 6 d** zeigt eine 40fache Vergrößerung des Schnittes aus Abb. 6 c. Deutliche Anfärbung der CD8+ T-Zellen (weisser Pfeil)

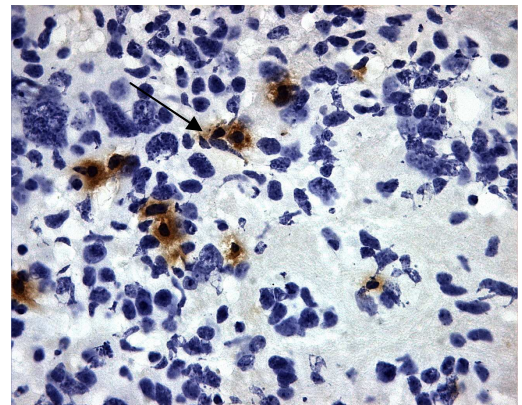


#### 4.4.11 Immunhistochemie GL261 in Wt und GF-IL12 Tier: CD4

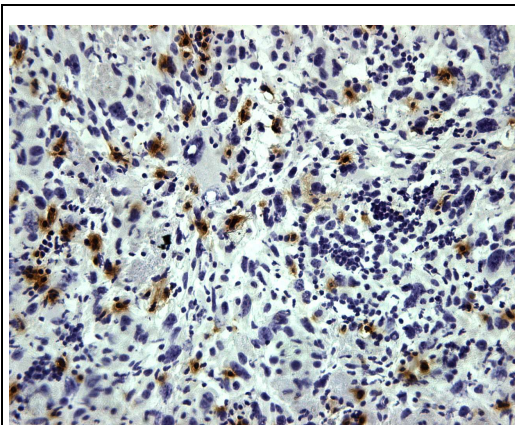


**Abb. 7 a** zeigt eine IHC für CD4 + T-Zellen. (Vergrößerung x20). CD4+ T-Zellen sind vor allem in der Peripherie zu finden.

CD4  
Wildtyp

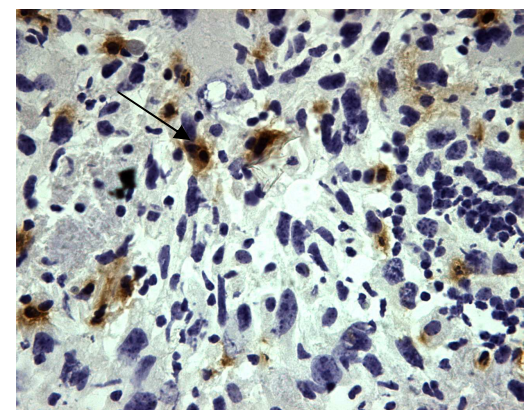


**Abb. 7 b** zeigt eine 40x Vergrößerung des Schnittes von Abb. 7 a. Deutliche Anfärbung der CD4 + T-Zellen. (schwarzer Pfeil)



**Abb. 7 c** zeigt eine IHC für CD4 + T-Zellen. (Vergrößerung x20). CD4+ T-Zellen sind vor allem in der Peripherie zu finden.

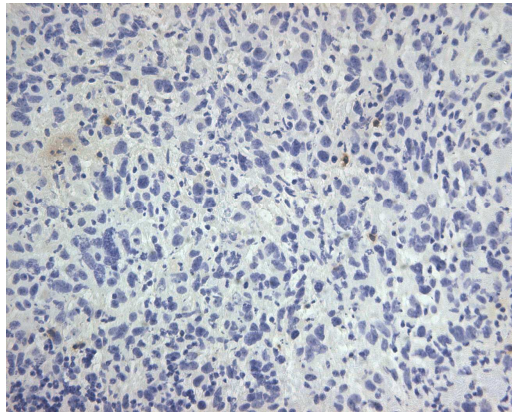
CD4  
GF-IL 12



**Abb. 7 d** zeigt eine 40x Vergrößerung des Schnittes von Abb. 7 c. Deutliche Anfärbung der CD4 + T-Zellen. (schwarzer Pfeil)

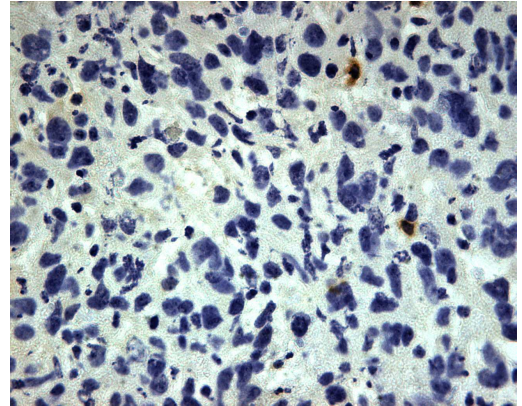


#### 4.4.12 Immunhistochemie GL261 in Wt und GF-IL12 Tier: CD45 Rezeptor

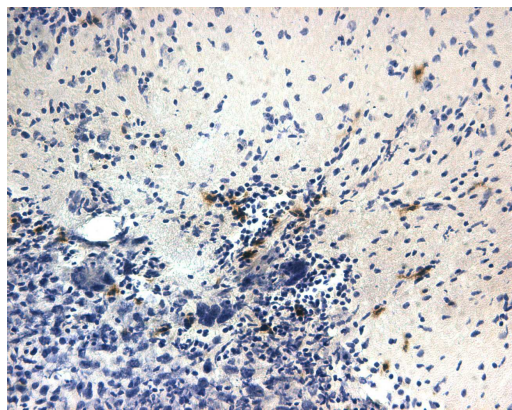


CD45 R  
Wildtyp

**Abb. 8 a** zeigt einen GL 261 Tumor eines Wt Tieres, der mit dem B-Zellmarker CD45 R markiert wurde. (Vergrößerung 20x)

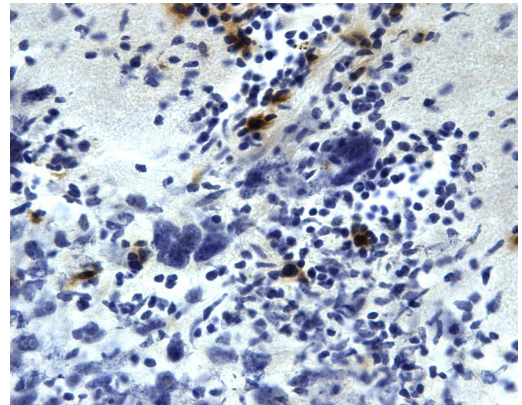


**Abb. 8 b** zeigt eine 40x Vergrößerung des Schnittes von Abb. 8 a. Kein spezifischer B-Zell-Nachweis.



CD45 R  
GF-IL 12

**Abb. 8 c** zeigt einen GL 261 Tumor eines Wt Tieres, der mit dem B-Zellmarker CD45 R markiert wurde. (Vergrößerung 20x)



**Abb. 8 d** zeigt eine 40x Vergrößerung des Schnittes von Abb. 8 c. Kein spezifischer B-Zell-Nachweis.

**Abb. 5-8** zeigt die Immunohistochemische Charakterisierung von Infiltrierenden Leukozyten in das Cerebellum von Wt and GF-IL12 Mäusen drei Wochen nach Implantation der GL261 Tumorzellen.

#### 4.5 Zytokinexpression auf mRNA-Ebene dargestellt

Die RNA-Expression von Interleukinen und Entzündungsmarkern wurde in GF-IL12 tg und Wt-Tieren untersucht. Es wurden auch Tiere ohne eine Tumordinjektion und die Tumorzellen selbst untersucht.

Im ersten RPA (siehe Tabelle 16, Abb. 9) wurde die RNA folgender Entzündungsmarker untersucht: ICAM, iNOS, Mac-1, EB 22/5. Zudem wurde nNos, eNOS und GFAP untersucht. Es zeigte sich, dass alle Entzündungsmarker in den GF-IL12 tg Tieren aufreguliert wurden und dass diese Reaktion unabhängig von einer Tumorumplantation war.

Die tumorimplantierten Wt-Mäuse exprimierten ICAM, nNOS, Mac-1, eNOS, EB 225, GFAP. Im Gegensatz dazu exprimierten die nicht implantierten Wt-Tiere nur nNOS, eNOS und GFAP. Die Tumorzellen selbst exprimierten eNOS, EB 22/5, aber kein GFAP.

	ICAM	nNOS	iNOS	Mac-1	eNOS	EB 22/5	GFAP	RPL32
GF-IL 12 mit Tumor	+	+	+	+	+	+	+	+
GF-IL 12 ohne Tumor	+	+	+	+	+	+	+	+
Wt mit Tumor	+	+	-	+	+	+	+	+
Wt ohne Tumor	-	+	-	-	+	-	+	+
GL 261Tumorzellen	-	-	-	-	+	+	-	+

**Tab.16** zeigt (+) = Expression (-) = keine Expression von mRNA

In einem zweiten RPA wurde die RNA-Expression von TNF-alpha, TNF-beta, IL-4, IL-5, IL-1alpha, INF-gamma, IL-2, IL-6 und IL-1beta untersucht. In den GF-IL12 tg Tieren kam es zu einer Aufregulation von TNF-alpha, TNF-beta, IL-1alpha, INF-gamma, IL-6 und IL-1beta unabhängig von einer Tumorumplantation. Die Wt-Tiere, die eine Tumorumplantation erhielten, exprimierten TNF-alpha, IL-1alpha, INF-gamma, IL-6 und IL-1beta. Das Expressionsmuster der Wt-Tiere ohne Tumorumplantation wies nur TNF-alpha und IL-1alpha sehr schwach nach. Die Tumorzellen GL261 selbst exprimierten mRNA für TNF-alpha und für IL-6. (siehe Tabelle 17)

	TNF beta	TNF alpha	IL-4	IL-5	IL-1 alpha	IN-Fgamma	IL-2	IL-6	IL-1beta
GF-IL 12 mit Tumor	+	+	-	-	+	+	-	+	+
GF-IL 12 ohne Tumor	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Wt mit Tumor	-	+	-	-	+	+/-	-	+	+
Wt ohne Tumor	-	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-
GL 261Tumorzellen	-	+	-	-	-	-	-	+	-

**Tab.17** zeigt (+) = Expression, (-) = keine Expression, (+/-) = schwache Expression. Beachte die geringe Expressionsrate an TNF-alpha und IL-1alpha in den Wt-Tieren ohne Tumor und das schwach aufregulierte INF-gamma in den Wt Tieren mit Tumorumplantation.

In einem dritten RPA wurde IL-3, IL-10, GM-CSF, TGF $\beta$ , IL-13, IL-12p35, IL-12p40 und IL-7 untersucht. IL-3 wurde in keinem Versuchstier und auch nicht im Tumorge- webe exprimiert. IL-10 wurde in den GF-IL12 tg Tieren unabhängig von einer Tumor- implantation exprimiert. In den Wt-Tieren mit Tumorimplantation wurde IL-10 etwa gleich stark exprimiert wie in den GF-IL12 tg Tieren, wobei ein Versuchstier mit Tu- morimplantation kein IL-10 exprimierte. Die Wt-Tiere ohne implantierten Tumor und der Tumor selbst exprimierten kein IL-10.

Die Expressionsrate des Wachstumsfaktors GM-CSF war wiederum unabhängig von einer Tumorimplantation und in den GF-IL12 tg Versuchstieren deutlich nachweisbar. Zum Teil wurde GM-CSF auch in den tumorimplantierten Wt-Tieren nachgewiesen. In Wt-Tieren ohne Tumorimplantation war das GM-CSF nicht nachzuweisen. Die Tumorzellen selbst exprimierten kein GM-CSF.

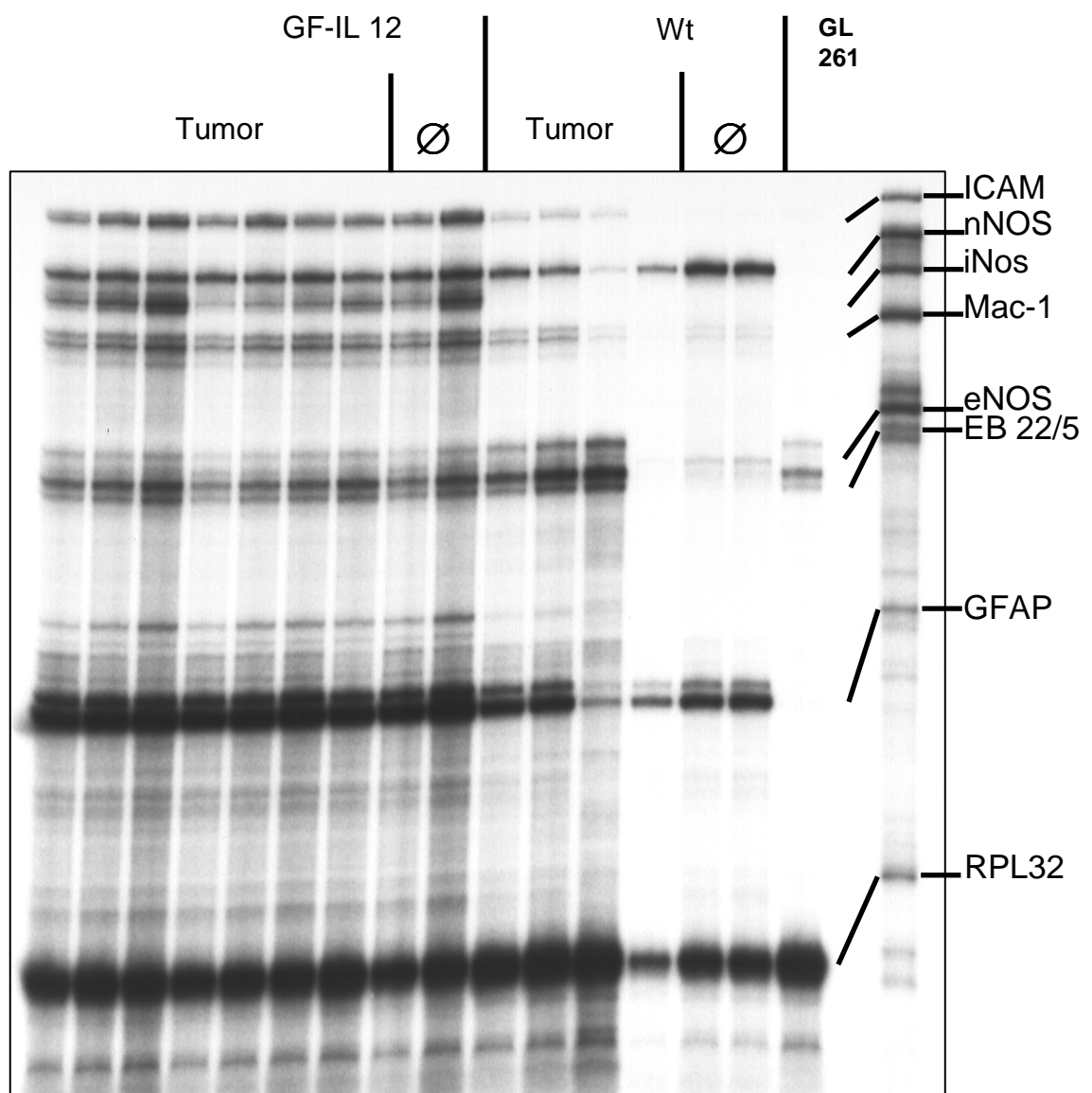
Das TGF-beta hatte ein konstantes Expressionsmuster in allen Versuchstieren und dem Tumor. In den GF-IL12 tg Tieren war die TGF-beta Expression unabhängig von einer Tumorimplantation. Bei den tumorimplantierten GF-IL12 tg Tieren waren die TGF-beta-Banden deutlich stärker nachzuweisen als bei den tumorimplantierten Wt- Tieren. Die TGF-beta-Banden der Wt-Tiere mit Tumorimplantation waren wiederum stärker ausgeprägt als bei Wt-Tiere ohne Tumorimplantation. Die TGF-beta-Banden der Tumorzellen waren mit den Banden der Wt Tiere ohne Tumor vergleichbar.

Die Banden von IL-12p35 und IL12p40 wurden nur in den GF-IL12 transgenen Ver- suchstieren exprimiert, unabhängig von einer Tumorimplantation. Tabelle 18 gibt ei- nen Überblick über die Expressionsraten.

	IL-3	IL-10	GM-CSF	TGF $\beta$	IL-13	IL-12p35	IL-12p40	IL-7
GF-IL 12 mit Tumor	-	+	+	++	-	+	+	+
GF-IL 12 ohne Tumor	-	+	+	++	-	+	+	+
Wt mit Tumor	-	+	+/-	+	-	-	-	+
Wt ohne Tumor	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GL 261Tumorzellen	-	-	-	+/-	-	-	-	-

**Tab.18** zeigt (++) = starke Expression, (+) = Expression, (-) = keine Expression (+/-) = schwache Ex- pression. Die Expressionsrate der beiden Banden IL-12 p40 und IL-12 p35 ist unabhängig von einer Tumorimplantation.

#### 4.5.1 Rnase-Protection-Assay: Entzündungsmarker



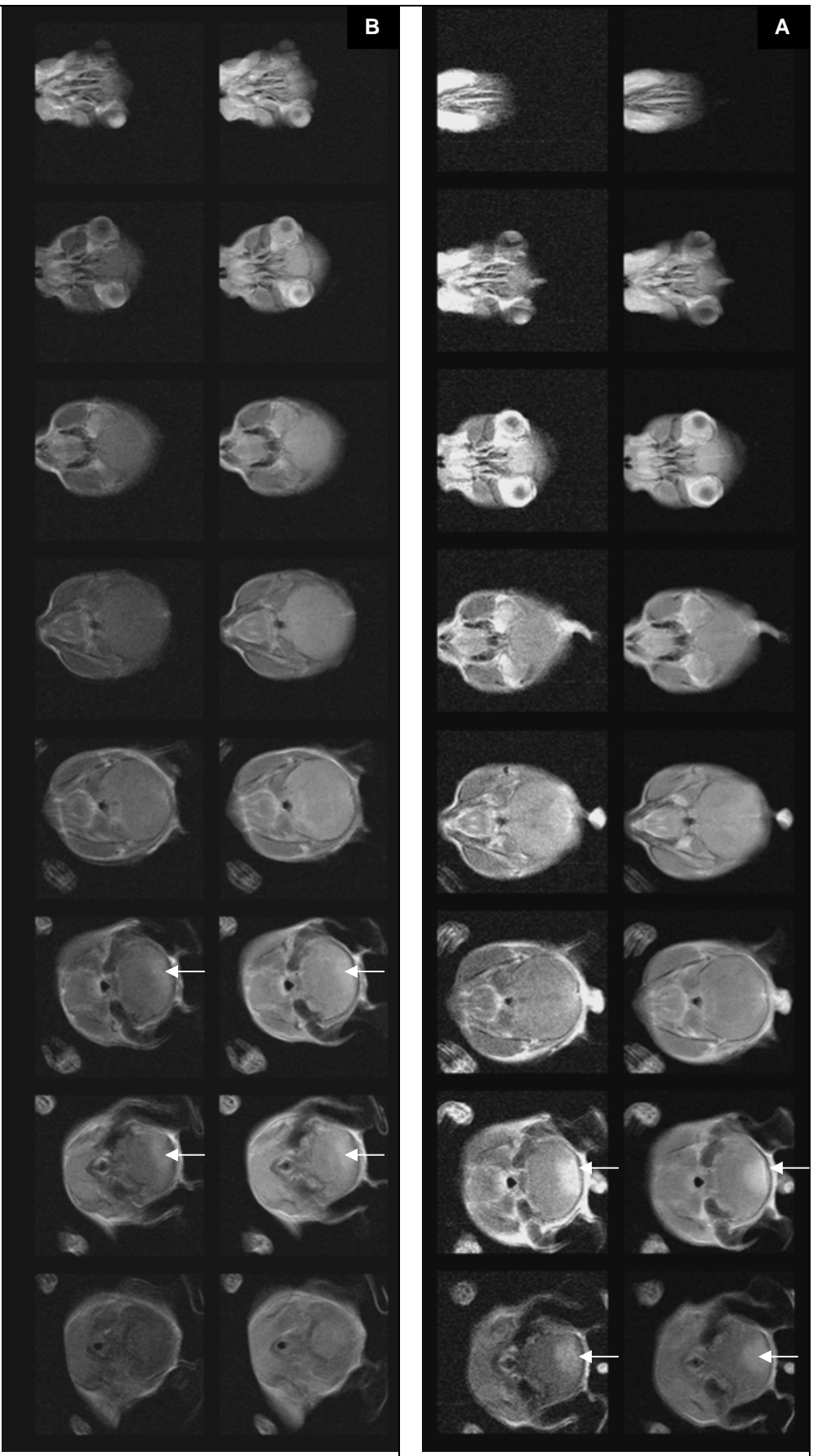
**Abb. 9** zeigt exemplarisch einen RPA mit ICAM, nNOS, iNOS, Mac-1, eNOS, EB 22/5, GFAP. Siehe auch Tabelle 16.

#### 4.6 Darstellung der Tumore in einer kraniellen MRI

In einem GF-IL12 tg Tier und Wt-Tier zeigte sich jeweils ein großer Tumorbefund. Die Ausdehnung der Tumore im Cerebellum und die dadurch ausgelöste Blut-Hirn-Schrankenstörung war deutlich zu erkennen. Die Bilder wurden mit Gadolinium-Kontrastmittel aufgenommen. Sowohl in T1 als auch in T2 Gewichtung konnte man eine hyperintense rundlich ovale Raumforderung sehen, welche scharf begrenzt war. Das Ausmaß des Hirn-Ödems war gering (siehe T2 Gewichtung). Der Tumor im GF-IL12 tg Tier hatte ein berechnetes Volumen von 29,54 mm<sup>3</sup>. In der Histologie ergab sich eine berechnete Größe von 17,87 mm<sup>3</sup> (- 39%). Der Tumor im Wt-Tier hatte ein Volumen von 45,95 mm<sup>3</sup>. In der Histologie zeigte sich eine berechnete Größe von 35,67 mm<sup>3</sup> (- 22,37%).

Versuchstier	Tumorgröße [mm <sup>3</sup> ] MRI	Tumorgröße [mm <sup>3</sup> ] Histologie	Differenz [mm <sup>3</sup> ] absolut	Differenz [%]
# 82 Wt	45,95	35,67	10,28	- 22,37
# 80 GF-IL12	29,54	17,87	11,67	- 39,05

**Tab. 19** zeigt die Tumorumfänge eines Wt-Tieres und eines GF-IL12 tg Tieres. Dabei sind die Werte der neuroradiologischen Bestimmung gegenüber der histologischen Methode aufgetragen.



**Abb. 10 a und b** zeigt eine kraniale Magnet-Resonanz-Tomographie Aufnahme von den Versuchstieren. In Abb. a ist die Aufnahme eines Wt Tieres abgebildet. In Abb. b ist ein GF-IL 12 Tier abgebildet. Die obere Reihe der MRT-Serie zeigt jeweils ein T1 gewichtetes Bild, während die untere Reihe jeweils ein T2 gewichtetes Bild zeigt. Die Aufnahmen sind mit dem Kontrastmittel Gadolinium durchgeführt worden. Die kleinen weißen Pfeile zeigen den Tumor. Mit Hilfe des MRT konnte auch eine Volumenbestimmung durchgeführt werden.

#### 4.7 Der makroskopische Tumorbefund

Eine erste Einschätzung der Tumorgöße ermöglichte der makroskopische Befund. (Siehe Abschnitt 4.7.1) Nach vier Wochen hatten 92,8% aller Wt-Tiere und 37,5% der GF-IL12 tg Tiere einen makroskopisch bis an die Hirnoberfläche reichenden Tumor.

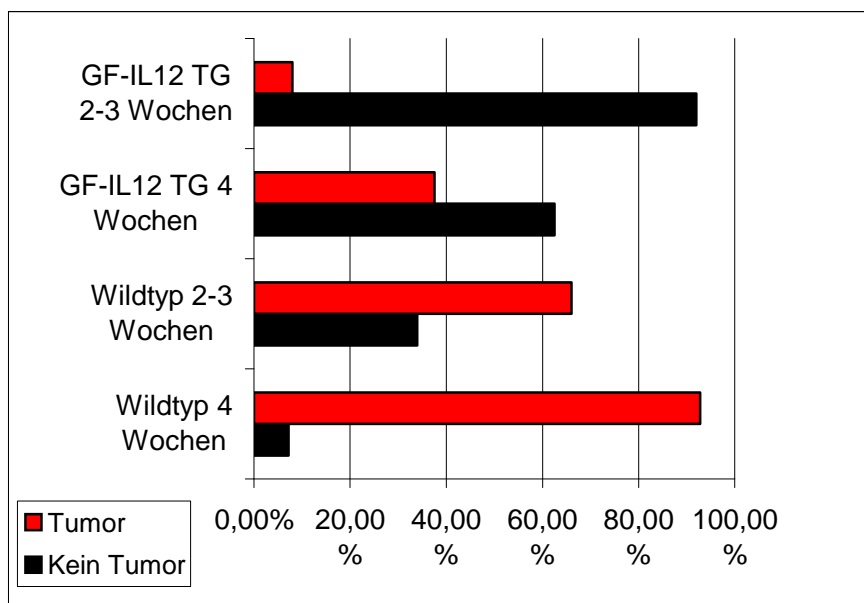
Zwei bis drei Wochen nach Implantation hatten 34% der Wt-Tiere gegenüber 92% der GF-IL12 tg Tiere keinen makroskopischen Tumor. Die makroskopischen Tumore waren ab einem Tumolvolumen von 10 – 15 mm<sup>3</sup> meist an der Gehirnoberfläche erkennbar.

Weitere charakteristische Merkmale des makroskopischen Befundes waren: Gefäßneubildungen an der Tumoroberfläche, Nekrosen und damit verbundene Deformitäten der Hemisphären. In manchen Fällen wuchsen die Tumoren destruiierend durch die Schädelkalotte.

##### 4.7.1 Übersicht der makroskopischen Tumorbefunde in GF-IL12 und Wt Tieren

4 W. nach Implantation	Makro-Tumor	Kein Makro-Tumor	Summe
Wt	13 (92,8%)	1 (7,2%)	14 (100%)
GF-IL12	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8 (100%)

2-3 W. nach Implantation	Makro-Tumor	Kein Makro-Tumor	Summe
Wt	8 (66%)	4 (34%)	12 (100%)
GF-IL12	1 (8%)	12 (92%)	13 (100%)



**Abb.11** zeigt Sektionsbefunde der Wt und GF-IL12 tg Tiere für makroskopische Tumore. (vorhanden = rot, nicht vorhanden = schwarz).

Nahezu 100% der Wt-Tiere hatten nach vier Wochen einen makroskopischen Tumor.

#### **4.8 Tumorvolumenbestimmung**

Um die Wirkungen des IL-12 auf die TumorgroÙe zu untersuchen, wurde eine histologische GröÙenbestimmung mittels Vibratomschnitten durchgeföhrt (siehe Abb. 12 a-b und Abschnitt 4.8.1). Die Volumenbestimmung wurde in einer ersten Versuchsreihe vier Wochen nach Implantation durchgeföhrt. Für die Wt-Tiere (n=13) ergab sich ein Mittelwert der Tumorvolumina von 44,41 mm<sup>3</sup> (Standardabweichung 20,04). Für die GF-IL12 tg Tiere (n=8) ergab sich ein Mittelwert der Tumorvolumina von 15,86 mm<sup>3</sup> (Standardabweichung 14,16). Das ergab eine Volumendifferenz von durchschnittlich 28,55 mm<sup>3</sup> (64,29%). Diese Differenz war statistisch signifikant ( $p \leq 0,0013$ , Mann Whitney U-Test). Tabelle 20 gibt eine Übersicht über die GröÙe der einzelnen Tumore und die Symptome der Tiere. In Abbildung 12 und 13 sind die einzelnen Tumorvolumina aufgeföhrt.



#### 4.8.1 Histologie zur Bestimmung der Tumervolumina in GF-IL12 und Wt-Tieren

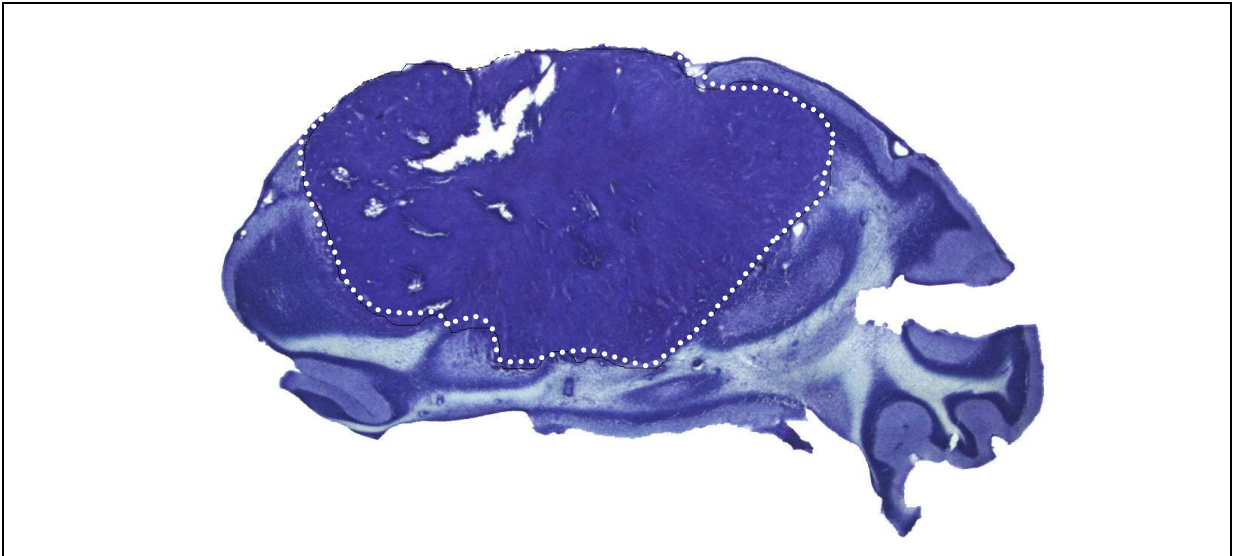


Abb. 11 a zeigt einen 70  $\mu$ m Vibratomschnitt (Koronarschnitt) in Kresylviolett eines Wildtyp-Tieres, drei Wochen nach Tumorimplantation. Die weiß gepunkteten Linie zeigt die Ausdehnung des Tumors.

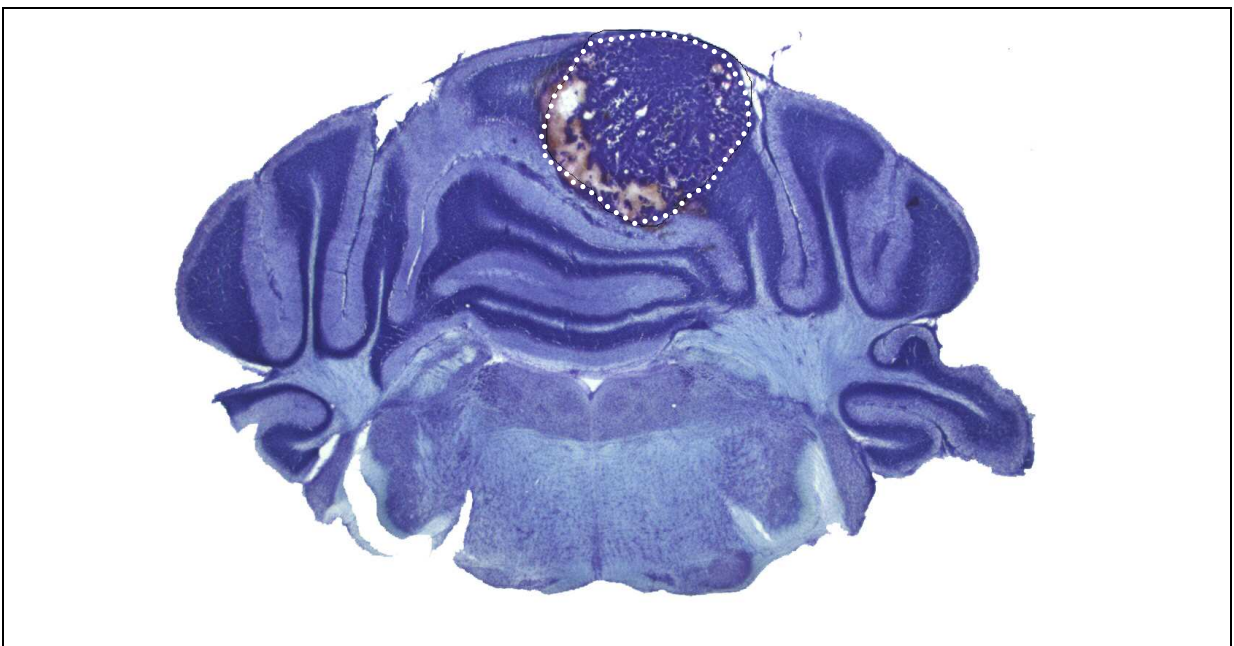


Abb. 11 b zeigt einen 70  $\mu$ m Vibratomschnitt (Koronarschnitt) in Kresylviolett eines GF-12 transgenen Tieres, drei Wochen nach Tumorimplantation. Die Tumorschnittfläche ist um ein vielfaches kleiner als die des Wt-Tieres in Abb. 11 a

#### 4.9 Korrelation von Tumorgröße und klinischem Verlauf

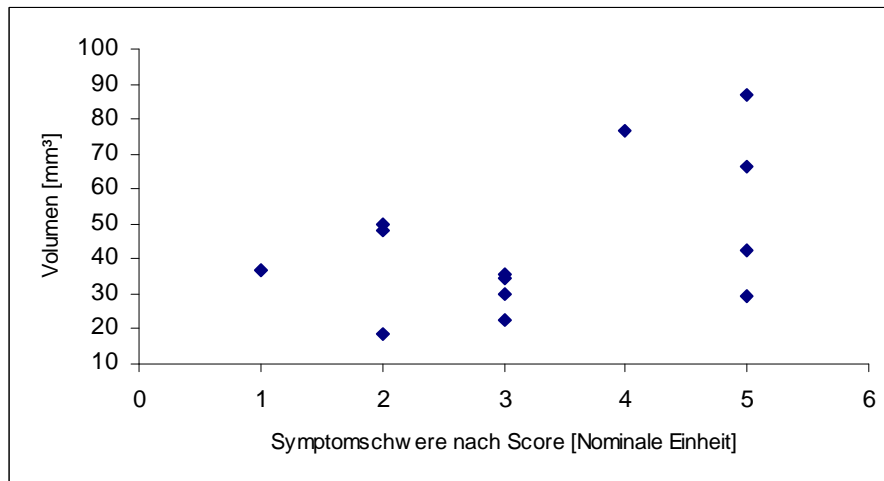
Die Versuchstiere wurden jeden zweiten Tag auf klinische Symptome untersucht. In der Wt Gruppe war eine deutlich schwerere Symptomatik zu erkennen (siehe Abbildung 1 a-b). Die Tumervolumina wurden in Relation zur klinischen Symptomatik ge-

setzt. (Abbildung 12 a-b) Für die klinische Symptomatik wurde der Symptom-Score verwendet. (Siehe Abschnitt 4.2.2) Bis auf ein Tier (Tumolvolumen = 36 mm<sup>3</sup>) wurden in der Wt Gruppe (n=13) alle Tiere krank. Überraschenderweise hatte das Tier mit dem kleinsten Tumolvolumen von 18,39 mm<sup>3</sup> bereits eine schwere Ataxie. Ein Versuchstier (Tumolvolumen: 42,32 mm<sup>3</sup>) wurde schwerstkrank (Symptomscore von 4-5 Punkten). Die Symptomatik äußerte sich in einer ausgeprägten Ataxie, Gangstörung, Verlangsamung, Hemiparese und einem Gewichtsverlust von 16,67%. Das Tier mit dem zweitgrößten Tumolvolumen (76,91 mm<sup>3</sup>) hatte überraschenderweise keinerlei Paresen entwickelt. Der klinische Zustand war aber schlecht mit einem Symptom-Score von 4. In diesem Modell hatte die Tumorlokalisation wahrscheinlich einen größeren Einfluss auf die Symptomatik als die Tumorgröße.

In der Gruppe der GF-IL12 tg Mäuse hatten die Tiere mit den kleinsten Tumorumfängen (0,50 mm<sup>3</sup>; 0,55 mm<sup>3</sup>; 0,75 mm<sup>3</sup> und 15,25 mm<sup>3</sup>) auch keine klinische Symptomatik. Auch der gemessene Gewichtsverlauf war für diese Tiere unauffällig, sie gewannen während des Beobachtungszeitraums durchweg an Gewicht.

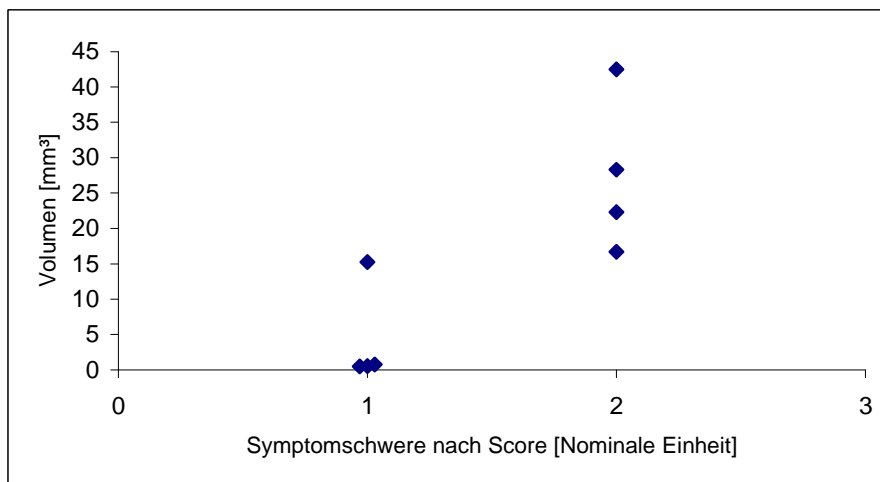
Die Tiere mit den beiden größten Tumoren (28,3 mm<sup>3</sup> und 42,47 mm<sup>3</sup>) hatten eine den Wt-Tieren entsprechende schwere Symptomatik. Sie wurden mit einer Ataxie und allgemeinen Verlangsamung mit zwei Punkten auf dem Symptome-Score bewertet. Die Tiere mit mittleren Tumorgößen (16,71 mm<sup>3</sup> und 22,33 mm<sup>3</sup>) hatten eine Ataxie und AZ-Verminderung und wurden damit ebenfalls mit einem Symptom-Score von zwei bewertet.

#### 4.9.1 Tumorzvolumen/Symptomscore (Wt)



**Abb. 12 a** zeigt die Wertpaare Tumorzvolumen [mm³] und Symptomschwere bei den Wt Tieren nach Symptomscore (Siehe Abschnitt 4.2.2)

#### 4.9.2 Tumorzvolumen/Symptomscore (GF-IL12)



**Abb. 12 b** zeigt die Wertpaare Tumorzvolumen [mm³] und Symptomschwere nach Symptomscore der GF-IL 12 tg Versuchstiere.

#### 4.9.3 Übersicht der Tumorumfänge, Symptomen und Symptom-Score

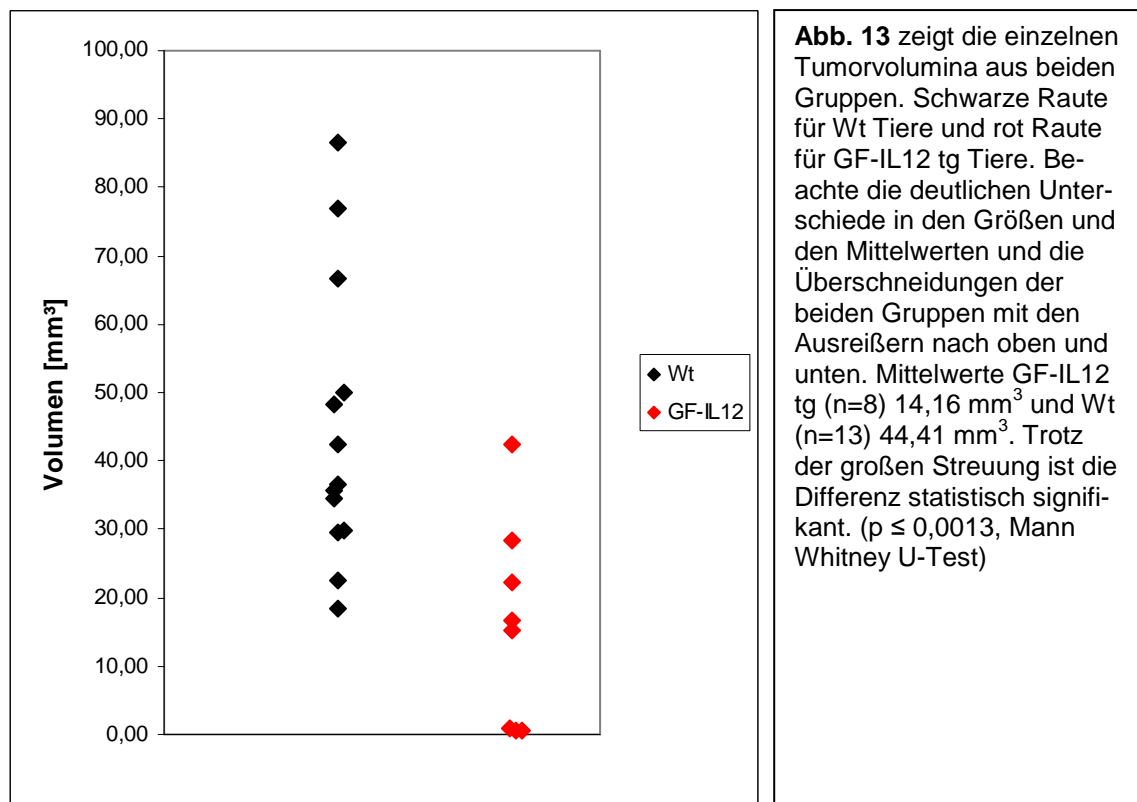
#	Bezeichnung	Volumen [mm <sup>3</sup> ]	Symptome am Sektionstag (d=25-28)	Symptom-Score (Schwere der Krankheit)*
	<b>Wildtyp</b>			
1	67	29,52	totkrank wirkendes Tier, stark verlangsamt, Ataxie, Parese	5
2	65	35,56	Ataxie, Verlangsamung	3
3	69	29,72	AZ schlecht, Verlangsamung	3
4	70	76,91	AZ und EZ sehr schlecht, Verlangsamung, Sektionsgewicht 17,8 g	4
5	77	36,52	keine	1
6	82	34,51	Verlangsamung, AZ schlecht, Ataxie	3
7	89	66,53	Massivste Gangstörung, Ataxie, Verlangsamung, Hemiparese rechts	5
8	107	50,02	Ataxie	2
9	108	18,39	Ataxie	2
10	109	22,46	Milde Ataxie, Exophthalmus	3
11	110	42,32	Massive Gangstörung, Ataxie, Kachexie 14,6 g, Hemiparese rechts, Exophthalmus, sehr schlechter AZ und EZ	5
12	111	86,69	Massive Gangstörung, Ataxie, Hemiparese rechts.	5
13	114	48,21	Mäßige Verlangsamung	2
	<b>Durchschnitt</b>	<b>44,41</b>		<b>3,31</b>
	Standard Abweichung	20,04		

	<b>GF-IL12 tg</b>			
1	63	28,30	Ataxie, Verlangsamung	2
2	64	16,71	Ataxie	2
3	80	22,33	Ataxie	2
4	81	42,47	Ataxie, Verlangsamung	2
5	105	0,75	Keine	1
6	106	0,55	Keine	1
7	113	15,25	Keine	1
8	115	0,50	Keine	1
	<b>Durchschnitt</b>	<b>15,86</b>		<b>1,5</b>
	Standard Abweichung	14,16		
	<b>Relative Reduktion</b>	<b>64,30%</b>		

**Tab. 20** gibt einen Überblick über die einzelnen Tumorumfänge in den beiden Gruppen Wt und GF-IL12 tg.

\* Anhand der klinischen Untersuchungsbefunde und Symptome wurde ein subjektiver Score entworfen und das Tier am Sektionstag nach diesem Score eingeschätzt. (Siehe Abschnitt 4.2.2)

#### 4.9.4 Übersicht: Tumorumfängen der Wt und GF-IL12 tg Tieren



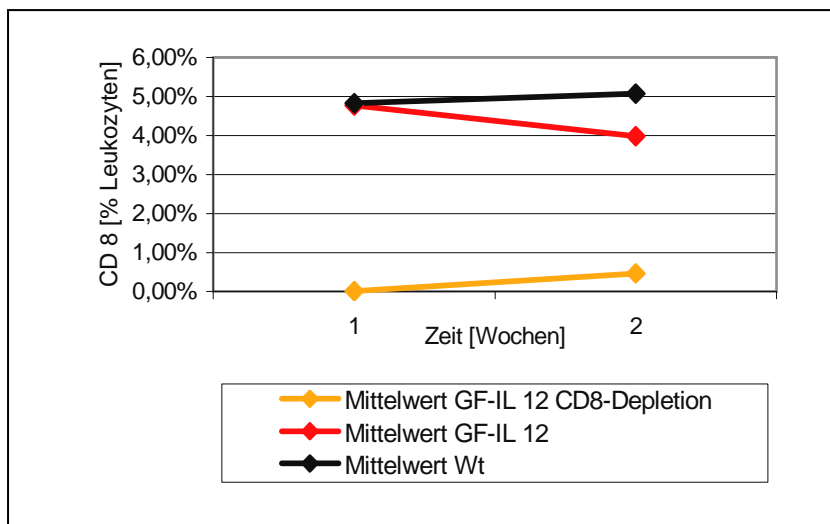
#### 4.10 Depletionsexperimente

##### 4.10.1 Depletion von CD8+ T-Zellen

Wie die Ergebnisse der Immunohistochemie zeigten, kam es in den GF-IL12 tg Tieren zu einer ausgeprägten CD8+ T-Zell-Infiltration in das Tumorgewebe und in die periphere Randzone der Tumore. Um den Stellenwert der CD8+ T-Zellen bei der IL-12 vermittelten Tumoralabstoßung zu ermitteln, wurden insgesamt zehn Tiere (GF-IL12 tg CD8 depletiert n=4, GF-IL12 tg nicht CD8-depletiert n=4, Wt nicht CD8 depletiert n=2) untersucht. Die Wirkung des eingesetzten monoklonalen Antikörpers wurde vor der Depletion und ein und zwei Wochen nach Depletion mit einer FACS-Analyse überprüft. Die durchschnittliche Konzentration der CD8+ T-Zellen im peripheren Blut für alle Tiere ist in Abbildung 14 wiedergegeben. Drei Wochen nach Tumorimplantation wurden die Tiere seziert, Vibratomschnitte der Kleinhirne angefertigt und die Tumorgößen analog der ersten Versuchsreihe errechnet.

Das Tumolvolumen der beiden Wt-Tiere lag bei 27,60 mm<sup>3</sup> und 49,76 mm<sup>3</sup>. (Mittelwert 38,68 mm<sup>3</sup>) Die Volumina der vier GF-IL12 tg Tiere lagen bei 11,35 mm<sup>3</sup>, 47,20 mm<sup>3</sup>, 15,51 mm<sup>3</sup> und 0 mm<sup>3</sup>. (Mittelwert: 18,52 mm<sup>3</sup>, Standardabweichung: 17,5) Die Tumolvolumina der GF-IL12 tg Tiere ohne CD8+ T-Zellen lagen mit 17,05 mm<sup>3</sup>, 29,97 mm<sup>3</sup>, 31,06 mm<sup>3</sup> und 21,89 mm<sup>3</sup> (Mittelwert: 24,99 mm<sup>3</sup>, Standardabweichung: 5,8) zwischen den GF-IL12 tg und Wt-Tieren. Die Tumore in den GF-IL12 tg Tieren ohne CD8+ T-Zellen-Depletion waren durchschnittlich um 35% kleiner als die Tumore in den GF-IL12 transgenen Tieren mit einer Depletion und um 52% kleiner als in den Wt Tieren.

#### 4.10.2 Konzentration der CD8+ T-Zellen nach Anti-CD8 Applikation



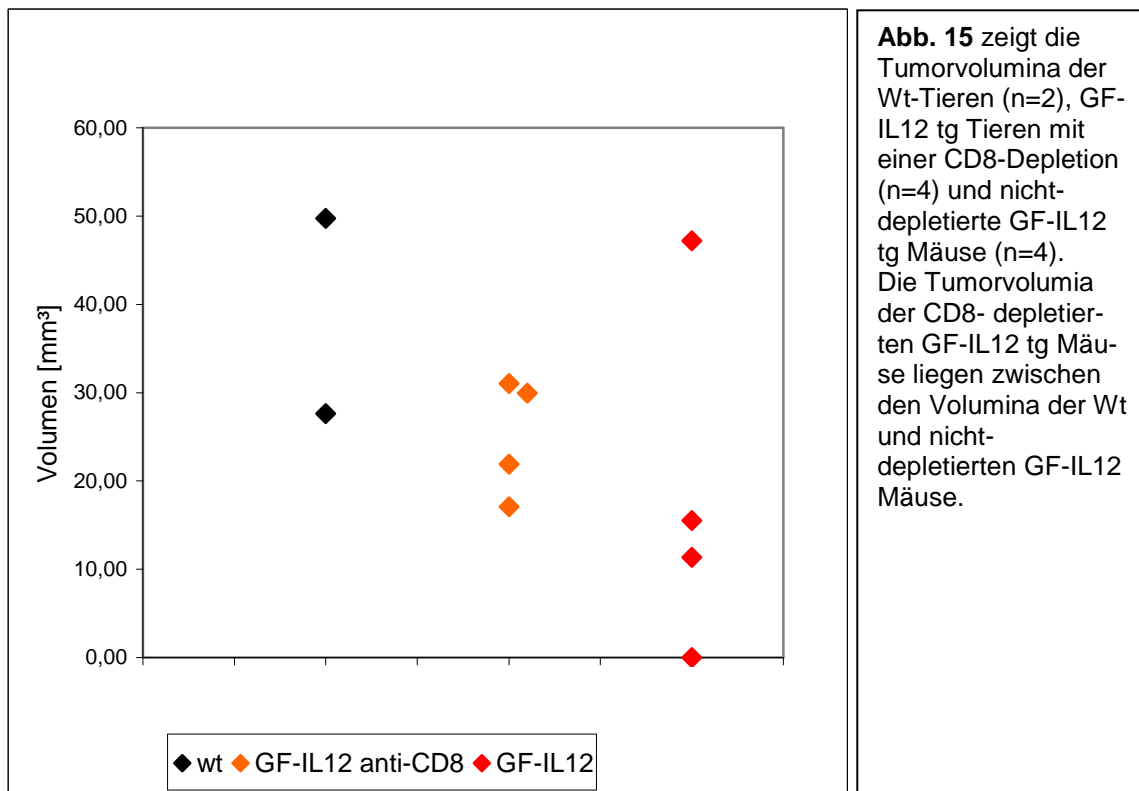
**Abb. 14** zeigt den Verlauf der CD8+ T-Zellen nach Applikation des mAB anti-CD8. Beachte die konstant hohen Leukozytenwerte der Tiere, die keinen Antikörper erhielten. Mit Antikörpern geimpfte Tiere zeigten eine sehr langsam ansteigende Zellzahl. Auch nach 2 Wochen waren die CD8+ Zellen < 1%

#### 4.10.3 Datenübersicht CD8+ T-Zellen Depletion

#	Wt Volumen [mm <sup>3</sup> ]	GF-IL12 Volumen [mm <sup>3</sup> ]	GF-IL12 anti-CD8 mAb Volumen [mm <sup>3</sup> ]
1	27,60	11,35	17,05
2	49,76	47,20	29,97
3	-	15,51	31,06
4	-	0	21,89
<b>Mittelwert</b>	<b>38,68</b>	<b>18,52</b>	<b>24,99</b>
<b>Differenz zum Wt</b>		<b>20,16</b>	<b>11,69</b>
<b>Relativ</b>		<b>52 %</b>	<b>30 %</b>

**Tab. 21** gibt eine Übersicht der Tumolvolumina in mm<sup>3</sup> des CD8+ T-Zell-Depletion Experimentes. Die Größen der Tumolvolumina der CD8 depletierten Tiere lag zwischen den GF-IL12 tg und Wt Tieren.

#### 4.10.4 CD8-Depletion drei Wochen nach Tumorimplantation



#### 4.10.5 Depletion von CD4+ T-Zellen

Die CD8+ T-Zell-Depletions-Experimente zeigten den wichtigen Einfluss der CD8+ T-Zellen für die Tumorabstoßung. Um die Untersuchung zu vervollständigen, wurden in einem weiteren Experiment auch die CD4+ T-Zellen mit einem monoklonalen Antikörper depletiert. Nach drei Wochen wurde erneut eine Tumorumfangbestimmung durchgeführt. Bei dieser Versuchsreihe wurden auch nochmals zwei GF-IL12 tg Tiere mit einer CD8-Depletion untersucht.

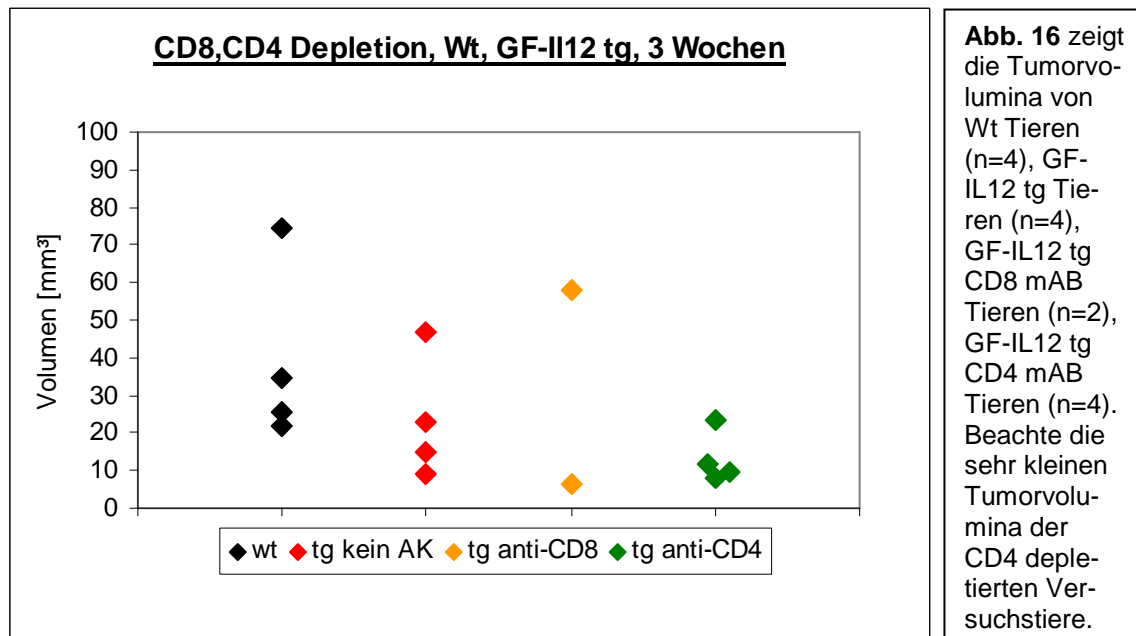
Es zeigten sich erneut sehr große Tumoren für die Wt Tiere (Mittelwert: 39,04 mm<sup>3</sup>, n=2) und kleinere Tumoren für die GF-IL12 tg Tiere (Mittelwert: 23,58 mm<sup>3</sup> n=4). Dies macht eine durchschnittliche Differenz von 15,46 mm<sup>3</sup> (39,60%) aus. GF-IL12 tg Tiere, bei denen die CD4+ T-Zellen depletierten wurden, zeigten deutlich kleinere Tumoren (Mittelwert: 13,26 mm<sup>3</sup> n=4) als die nicht depletierten GF-IL12 Tiere und Wt-Tiere. (Siehe Tabelle 22 und Abbildung 16)

#### 4.10.6 Tumorumfolumen CD8+,CD4+-T-Zell-Depletion

#	Wt	GF-IL12 tg kein AK	GF-IL12 tg aCD8	GF-IL12 tg aCD4
1 Volumen [mm <sup>3</sup> ]	74,29	47,04	6,36	8,11
2 Volumen [mm <sup>3</sup> ]	21,71	9,21	57,8	11,86
3 Volumen [mm <sup>3</sup> ]	34,39	15,15	-	23,57
4 Volumen [mm <sup>3</sup> ]	25,76	22,92	-	9,49
Mittelwert Volumen [mm <sup>3</sup> ]	39,04	23,58	32,08	13,26
Differenz zum Wt Volumen [mm <sup>3</sup> ]	0	15,46	6,96	25,77
Relativ [%]	0	39,60%	17,83%	66,01%

Tab. 22 gibt eine Übersicht über die Tumorumfolumina des CD4+ und CD8+ T-Zell-Depletion Experimentes. Die Tumorumfolumina der CD4+ T-Zell-depletierten Tiere sind noch kleiner als die Tumorumfolumina der GF-IL12 transgenen Versuchstiere ohne Depletion.

#### 4.10.7 Depletionsergebnisse für CD8 und CD4 Depletion



#### 4.11.1 Versuchstiere ohne B- und T-Lymphozyten (CRAG)

Mit einer weiteren Versuchsreihe sollten die Wirkungen der NK-Zellen untersucht werden. Die verwendeten Versuchsmäuse hatten eine homozygote Disruption des RAG2-Gens. Sie besaßen damit weder reife T- noch B-Lymphozyten, hatten jedoch noch NK-Zellen. Geplant war dann wieder ein Vergleich der Tumorumfolumina zwischen GF-IL12 tg CRAG Tieren und Wt CRAG Tieren.

Eines der Wt-Tiere verstarb bereits am 11. postoperativen Tag, es hatte bereits makroskopisch einen großen Tumor. Alle Tiere wurden schwer krank und drei von vier zeigten einen deutlichen Gewichtsverlust (> 10% in drei Wochen). Der klinischen



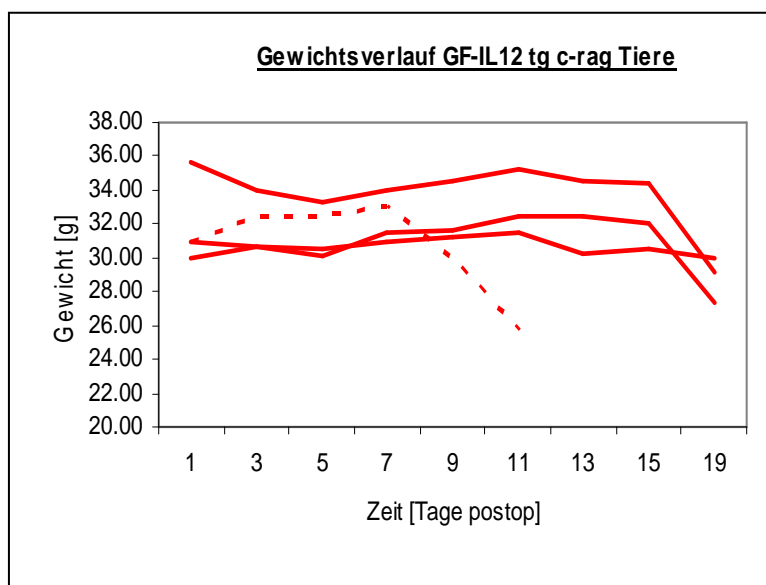
Symptomatik mit AZ-Verschlechterung und Ataxie entsprach ein Tier der Wt-Gruppe mit kompetentem Immunsystem nach Tumorimplantation. Die makroskopischen Tumorbefunde waren unabhängig von einer IL-12 Expression außerordentlich groß. Die Gehirne zerfielen bei der Sektion zum größten Teil. Deutliche Knochendestruktionen konnten nachgewiesen werden. Eine histopathologische Auswertung war nicht mehr möglich. Von weiteren Versuchen sahen wir zugunsten der eindrücklichen makroskopischen Befunde ab. Nach vorsichtiger Schätzung lagen die Tumorumfänge bei deutlich  $> 60 \text{ mm}^3$  und damit über dem mittleren Volumen der Tumore der Wt-Tiere.

#### 4.11.2 Übersicht des Gewichtsverlaufes der CRAG Tiere

Tag postoperativ	Tier #1	Tier #2	Tier #3	Tier #4
1	30,00	31,00	35,70	31,00
3	30,70	30,60	34,00	32,50
5	30,50	30,10	33,30	32,50
7	31,00	31,50	34,00	33,00
9	31,20	31,70	34,50	30,00
11	31,50	32,40	35,20	25,70
13	30,30	32,50	34,60	*
15	30,50	32,10	34,40	
19	30,00	27,40	29,10	
G'Verlust absolut	0,00	3,60	6,60	5,30
G'Verlust relativ	0%	-12%	-18%	-17%

Tbl. 23 zeigt den Gewichtsverlauf aller CRAG Tieren.

\* Exitus am 11. postoperativen Tag bei massivem Tumorbefund



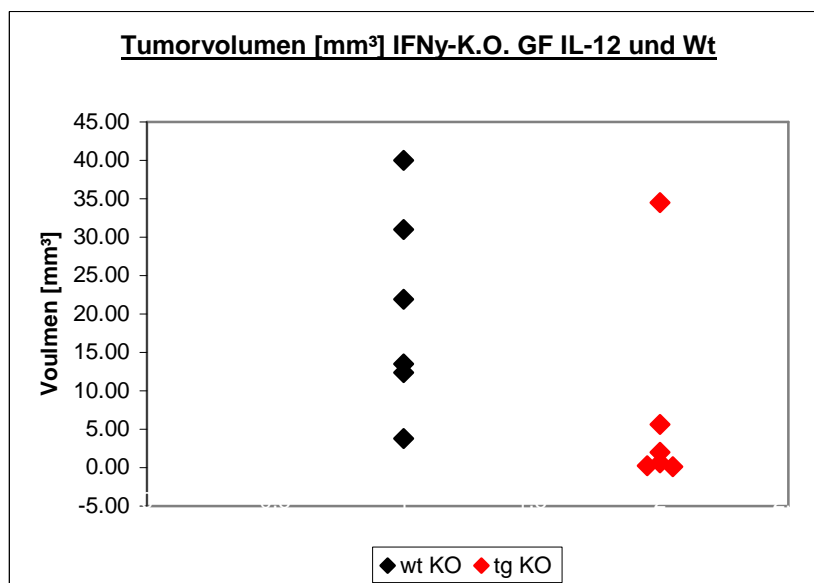
**Abb. 17** zeigt den Gewichtsverlauf der CRAG Tiere, die weder reife B- noch T-Zellen hatten. Es zeigte sich ein deutlicher Gewichtsverlust am Versuchsende ab Tag 15. Ein Tier (---) verstarb am 12. Tag, vermutlich an Hirndruck. Die klinische Symptomatik entsprach den normalen Wt Tieren: Ataxie, Kachexie, Retardierung, Parese und Verschlechterung des Allgemeinzustandes.

#### 4.12 INF-gamma Knock-out Versuchstiere (IC-Tiere)

IFN-gamma spielt eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung des IL-12 Effektes. So aktiviert es wahrscheinlich über den IFN-gamma Rezeptor CD8+ T-Zellen, welche dann eine Tumorabstoßung initiieren. In diesem Experiment sollte die Wirkung des IFN-gamma untersucht werden, dazu wurden GF-IL12 tg IFN-gamma K.O. Mäuse (n=6) und Wt IFN-gamma K.O. Mäuse (n=6) untersucht. Drei Wochen nach Tumorimplantation wurde dann erneut eine Größenbestimmung der Tumore durchgeführt. Es zeigte sich, dass GF-IL12 tg IFN-gamma K.O. Mäuse bis auf eine Ausnahme (Tumolvolumen = 34,50 mm<sup>3</sup>) durchweg kleinere Tumore hatten (Mittelwert: 7,18 mm<sup>3</sup>) als ihre Wt Geschwistertiere (Mittelwert 20,43 mm<sup>3</sup>). Die durchschnittliche Differenz lag bei 64,88% und entsprach damit der ersten Versuchsreihe. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden in Tabelle 24 und Abbildung 18 dargestellt.

Tier #	Tumolvolumen [mm <sup>3</sup> ] IFNgamma K.O. Wt	Tumolvolumen [mm <sup>3</sup> ] IFNgamma K.O. GF-IL12 tg
1	12,37	5,61
2	21,91	1,98
3	31,02	0,24
4	3,81	0,12
5	13,49	34,50
6	40,00	0,61
<b>Mittelwert</b>	<b>20,43</b>	<b>7,18</b>
<b>Differenz vom Wt</b>	0,00	<b>13,26</b>
<b>Relativ</b>	0,00	<b>64,88%</b>

**Tab. 24** gibt einen Überblick über die Tumolvolumina in den IFN-gamma K.O. Wt und GF-IL12 tg Versuchstieren.



**Abb. 18** zeigt die Tumolvolumina in den IFN-gamma K.O. Wt (n=6) und GF-IL12 tg Versuchstieren. (n=6). Es fanden sich kleinen Tumolvolumina in der GF-IL12 transgen IFN-gamma K.O. Versuchsgruppe entsprechend der ersten Versuchsreihe.

## **5. Diskussion**

Die Wirksamkeit von Interleukin-12 gegen Tumorwachstum ist in zahlreichen Studien untersucht und belegt. (9) (25) (83) Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkungen von endogen exprimiertem IL-12 in einem transgenen Mausmodell (73) auf einen stereotaktisch implantierten Hirntumor zu untersuchen. Dabei war von großem Interesse, ob das endogen vermehrt exprimierte IL-12 in diesem Modell zu einer Tumorabstoßung führte und welche Mechanismen für eine Tumorabstoßung verantwortlich waren. Insbesondere war auch von Interesse, ob es in diesem Modell zu einer besseren, vielleicht sogar vollständigen Tumorabstoßung kam als in den bekannten Tumormodellen. Es wurden die einzelnen Lymphozytensubgruppen CD4 +, CD8 + T-Zellen, NK-Zellen und das INF-gamma untersucht.

Ziel der Arbeit war auch, zu untersuchen, ob die Tiere, welche IL-12 selbst vermehrt exprimierten, dadurch einen klinischen Vorteil gegenüber den bekannten und vielfach untersuchten IL-12 Applikationsformen bei Gliomen hatten. (1) (25) (56)

### **5.1 Methodenkritik**

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Streubreite der einzelnen Tumervolumina. Wir vermuten, dass dies durch methodische Ursachen mit bedingt war. Wahrscheinlich kam es nach Applikation der Tumorzellen zu einem unterschiedlich starkem Abdrainieren der Zellen in die Liquorräume. Dort erfolgte dann eine Aktivierung des Immunsystems und eine Abstoßungsreaktion. Als weitere mögliche Ursachen wären eine unpräzise stereotaktische Implantation, unterschiedliche Qualität der Zellsuspensionen und die Kenntnisse des Operators zu nennen.

### **5.2 IL-12 tg Tiere hatten eine mildere oder keine Symptomatik**

In den durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die GF-IL-12 transgenen Versuchstiere eine deutlich mildere Symptomatik gegenüber den Wildtyp-Tieren zeigten. Keines der IL-12 tg Tiere verstarb während der Experimente. In einem Gliommodell der Ratten, bei dem IL-12 mittels s. c. Minipumpe appliziert wurde, konnte gezeigt werden, dass es zu einem deutlichen Überlebensvorteil der IL-12 behandelten Tiere kam. (44) 40% der behandelten Tiere entwickelten keinen Tumor. Auch in einem transgenen Hirntumormodell, bei dem es durch Expression des „large-T-Antigen“ von SV40 zur Entwicklung von Ependymomen kam, konnte gezeigt werden, dass die IL-12 Applikation zu einem günstigeren klinischen Verlauf mit einem

längeren Überleben führte. (87) Die Kontrolltiere verstarben in der Regel nach 100 Tagen an erhöhtem Hirndruck, sie hatten entsprechende klinische Symptome. Im Gegensatz dazu überlebten die IL-12 behandelten Tiere je nach Dosierung des IL-12 zwischen 120 und 126 Tage.

In den meisten Studien zu Hirntumoren und IL-12 Behandlung wird eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve gezeigt. (1) (75) Über den klinischen Verlauf wird meist nichts ausgesagt. Auch in anderen Tumormodellen, beispielsweise dem Blasenkarzinom (18) oder auch verschiedener Sarkome (52), wurde nicht näher auf die Symptomatik der Versuchstiere eingegangen. In einer Arbeit über die Zelllinien GL261 und GL26 aus den 70er Jahren wurde der klinische Verlauf nach cerebraler Implantation an Wildtyp-Tieren beschrieben. (2) Die Autoren zeigten, dass es nach 15 Tagen zu einer AZ-Verschlechterung, Gleichgewichtsstörungen, Ataxie und fokalen Ausfällen kam. Nähere Untersuchungen und Interpretationen des Gewichtsverlustes machten die Autoren jedoch nicht. Die Daten unserer Wildtyp-Tiere waren mit diesem Modell vergleichbar. Auch wir untersuchten den Gewichtsverlauf und stellten fest, dass es zu einer Tumorkachexie in der Wt-Gruppe kam.

### **5.3 Tumorkachexie wird durch Stoffwechselbeeinflussung des Tumors verursacht**

Cahlin und Mitarbeiter vermuteten, dass eine Tumorkachexie immunologisch durch Chemokine/Zytokine vermittelt wird. (13) Vor allem die Wirkung von Interleukin-6 spielt bei der Entstehung einer Tumorkachexie eine Rolle. Von Strassmann und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen IL-6 die Entstehung einer Kachexie unterdrücken können. (95) Auch wir untersuchten die Expressionsmuster der RNA von IL-6, allerdings nur die cerebrale Expression. In allen Tieren außer den Wt-Tieren ohne Tumorimplantation konnte eine cerebrale RNA-Expression von IL-6 nachgewiesen werden. Möglicherweise kam es bei unserem Modell in der Peripherie gar nicht zu einer erhöhten IL-6 Expression, dies wäre in einem Experiment noch nachzuweisen.

Bei diesem Tumormodell gehen wir davon aus, dass es mit progredientem Tumorstadium zu einer katabolen Stoffwechsellage kam. Diese These wird durch eine Arbeit von Morrison gestützt. (64) Die Autoren konnten an einem Tumormodell der Ratte zeigen, dass zwischen Tumorstadium und Kachexie bzw. Nahrungsaufnahme

eine Korrelation besteht. Svaniger und Mitarbeiter zeigten in einem Sarkommodell, dass mit Glucose gefütterte Ratten 14 Tage länger überleben. (97) Cahlin und Mitarbeiter zeigten, dass weder TNF-alpha noch IFN-gamma einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung einer Tumorkachexie im Mausmodell hatten. (13) Auch dies stützt die These, dass vor allem die progrediente Verschlechterung der Stoffwechselsituation zu einer Tumorkachexie führt.

#### **5.4.1 Tumore in den GF-IL 12 tg Tieren sind kleiner oder nicht nachweisbar**

Die GF-IL12 transgenen Versuchstiere hatten durchschnittlich um 64% kleinere Tumore als die Wt-Tiere.

Akasaki und Mitarbeiter untersuchten die Wirkung der Fusion einer dendritischen Zelle mit einer Gliomzelle in einem murinen Hirntumormodell. (1) Sie verabreichten rekombinantes IL-12 und konnten zeigen, dass es zu einer fast vollständigen Abstoßung bzw. 100% Verkleinerung der Tumore kam. (Tumordurchmesser gegen 0 mm). Bei Applikation von isolierten dendritischen Zellen und rekombinantem IL-12 war der Effekt auf die Tumorumfänge weniger stark ausgeprägt, aber die Tumordiameter waren weiterhin um mehr als 80% kleiner als in der entsprechenden Kontrollgruppe.

Jean und Kollegen untersuchten die Dosisabhängigkeit von IL-12 auf das Tumorumfängen in einem Gliommodell der Ratte. (44) Sie konnten zeigen, dass alle Tiere, die eine IL-12 Behandlung erhielten, kleinere Tumore hatten als die Kontrolltiere. Sie konnten auch zeigen, dass die Dosis des

IL-12 umgekehrt proportional zum Tumorumfängen war.

Roy und Kollegen konnten zeigen, dass es nach einer 10tägigen i. p. Therapie mit IL-12 zu einer > 90% Verminderung eines endogen entstandenen Tumors des Plexus choroideus kam. (87)

IL-12 ist ein Zytokin, welches in den verschiedenen Hirntumormodellen sehr gut wirksam war, es kam fast immer zu einer vollständigen Abstoßung des Tumorgewebes. In den oben beschriebenen Modellen wurde jeweils von extern IL-12 appliziert. Warum es in unserem Modell nicht immer zu einer Abstoßung kam und es zum Teil auch in der GF-IL12 Gruppe große Tumore gab, hing von verschiedenen Faktoren ab. Dabei ist der wichtigste, dass IL-12 nicht in allen Tieren produziert wurde.

#### **5.4.2 TGF-beta unterdrückt die Tumorabstoßung**

Tumore können immunsuppressive Faktoren produzieren, so dass sie vom Immunsystem nicht abgestoßen werden können. Dazu gehören Faktoren wie zum Beispiel TGF (4) (27) (50), FasL, B7-homolog 1 (108) oder HLA-G. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass TGF-beta ein Faktor ist, der die Immunreaktion unterdrückt und es dem Tumor ermöglicht, sich weiter auszubreiten. (84) (107) In den RP-Assays dieses Tumormodells konnte demonstriert werden, dass die Tumorzellen GL261 TGF-beta selbst produzieren und damit das Immunsystem unterdrücken können und es zu größeren Tumoren auch in der Gruppe der GF-IL12 tg Tieren kommen kann.

#### **5.4.3 Eine erschwerte Diapedese von immunkompetenten Zellen verhinderte eine vollständige Abstoßung des Tumors**

Eine weitere Ursache für die großen Tumoren in der GF-IL12 Gruppe könnte darin bestehen, dass immunkompetente Zellen nicht gut in das Tumorgewebe infiltrieren können. Dies konnte anhand der mikroskopischen Befunde der Immunohistochemie demonstriert werden. So gibt es physiologische Barrieren (Blut-Hirn-Schranke), welche von der Größe des Tumors abhängen. (36) Bis vor wenigen Jahren ist man davon ausgegangen, dass Immunzellen wegen der Blut-Hirn-Schranke nicht in das Hirnparenchym infiltrieren können. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass aktivierte Leukozyten problemlos durch die Blut-Hirn-Schranke diffundieren können. (39) In unserem Modell lagen die Lymphozyten vorwiegend in der Peripherie des Tumors, das Zentrum selbst war meist nur sehr schwach infiltriert. Damit kann letztendlich nicht das gesamte Tumorgewebe abgestoßen werden. Zu Beginn des Experimentes waren die Tumoren sehr klein. Lymphozyten hätten problemlos in das Gewebe eindringen können, warum dies nicht immer der Fall war bleibt offen.

#### **5.5.1 CD8+ T-Zellen bewirken eine Abstoßung des Tumors**

Es ist gut dokumentiert, dass IL-12 eine Tumorabstoßung über die zellulären Anteile des Immunsystems bewirkt, insbesondere über T-Lymphozyten und NK-Zellen. (45-47) In Mäusen, die einen Defekt der zellulären Immunität aufweisen, ist der IL-12 Effekt auf die Tumorabstoßung sehr gering bis nicht nachweisbar. (11) Bei Tumormodellen, welche die isolierte Rolle der NK-Zellen untersuchten, konnte gezeigt werden, dass der alleinige Effekt der NK-Zellen ausreichend ist, um Tumorzellen (102) oder

auch Metastasen (74) abzustößen. In einzelnen Tumormodellen fand man auch eine Infiltration mit Plasmazellen und postulierte eine Abwehr der Tumore durch Antikörper (113). Aber auch in diesem Modell wurden T-Zellen für eine Abstoßungsreaktion essentiell gebraucht.

In den meisten Tumormodellen werden CD8+ und CD4+ T-Zellen untersucht, beide Subpopulationen können eine Tumorabstoßung bewirken. (5) (36) (55) (56) (72) (91) Je nach Modell werden dann aber auch CD4+ oder CD8+ oder beiden Zellpopulationen eine führende Rolle bei der Abstoßung zugesprochen.

Liu und Mitarbeiter konnten in einem GL-26-Gliommodell zeigen, dass es durch die lokale Gabe von rekombinantem IL-12 mittels eines Adenovirus Vektors zu einer Tumordinfiltration von CD4+ und CD8+ T-Zellen kam. (56) Die gleiche Autorengruppe konnte den Effekt einer CD4+ und CD8+ T-Zellen Infiltration in einem Modell mit neuronalen Stammzellen nachweisen. (25) Sie konnten zeigen, dass es vor allem in den Randgebieten der Tumore zu T-Zellen Infiltrationen kam. Sie machten jedoch keine Aussage darüber, welche Subtypen der T-Zellen wichtiger waren in ihrem Tumormodell.

In einer Arbeit zu einem Metastasenmodell des Nierenzellkarzinoms wurde der Effekt von IL-12 untersucht. (80) Es konnte mittels monoklonalen Antikörpern gegen CD4+ und CD8+ T-Zellen gezeigt werden, dass vorwiegend die CD8+ T-Zellen für die Abstoßung der Tumorzellen gebraucht wurden. Die wichtige Rolle der CD8+ T-Zellen wurde bereits 1993 von Brunda in verschiedenen subkutanen Tumormodellen erkannt. (11) Von verschiedenen Autoren wurde die Funktion der CD4+ T-Zellen als Suppressor-Zellen beschrieben. CD4+ T-Zellen können eine Tumorabstoßung durch CD8+ T-Zellen sogar verschlechtern. (6) (29) (60;69) (92)

In manchen Tumormodellen spielen jedoch auch die CD4+ T-Zellen eine entscheidende Rolle für die Abstoßung von Tumorzellen und dies im besonderen auch ohne die Wirkung zytotoxischer CD8+ T-Zellen. (28) (30) (61) Die CD4+ T-Zellen erkennen die Tumorzellen über eine antigenpräsentierende Zelle oder das Antigen wird direkt über MHC II Moleküle auf der Tumorzelle präsentiert. (61) Die CD4+ T-Zellen können dann die identifizierten Tumorzellen direkt lysieren. Jedoch bilden die meisten Tumorzellen keine MHC II Moleküle, daher ist eine Abstoßung über diesen Mechanismus oftmals nicht möglich. (12) In einem aktuellen Tumormodell konnte Perez-Diez

zeigen, dass ein Zusammenwirken von CD4+ T-Zellen und NK-Zellen in manchen Tumormodellen sogar wirkungsvoller sein kann als der „Goldstandard“ der CD8 vermittelten Tumorabstoßung. (77)

In unserem Modell konnten wir nachweisen, dass es in den Tumoren der GF-IL-12 transgenen Tiere zu einer ausgeprägten Infiltration von CD8+ und CD4+ T-Zellen kam. Die Rolle von CD8+ Zellen bezüglich Tumolvolumen war in unserem Gliommodell herausragend. Dies konnten wir durch die Depletion der CD4+ Subpopulation demonstrieren. Diese Versuchstiere hatten durchweg kleinere Tumore als ihre nicht depletierten GF-IL12 transgenen Geschwistertiere. Die CD8 depletierten GF-IL12 Versuchstiere hatten dann wiederum deutlich größere Tumore als die nicht depletierten GF-IL12 Versuchstiere.

#### **5.5.2 Der Effekt auf die Tumorabstoßung durch NK-Zellen ist gering**

Die Rolle der NK-Zellen untersuchten wir mit CRAG Tiere. Diese Tiere wiesen einen Defekt des RAG-2 Gens auf und besaßen weder funktionierende T- noch B-Zellen. Es zeigten sich sehr große Tumoren, sowohl für die GF-IL12 tg als auch für die Wt-Tiere. Damit konnte die essentielle Rolle der T-Zellen in diesem Modell belegt werden. Die Autorengruppe um Brunda konnte bereits 1993 zeigen, dass NK-Zellen nicht essentiell sind für eine IL-12 vermittelte Tumorabstoßung. (11) Zudem konnten wir anhand der Immunohistochemieergebnisse zeigen, dass in diesem Modell die B-Zellen ebenfalls nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Die meisten Arbeiten zu IL-12 beschreiben die wichtige zytotoxische Funktion der CD8+ T-Zellen. Dies konnten auch wir in diesem Gliommodell GL261 nachweisen. Die Rolle der NK-Zellen ist untergeordnet.

#### **5.6 Die zelluläre Tumorabstoßung in unserem Modell ist unabhängig von INF-gamma**

Interleukin-12 führt bei der Prägung von T-Zellen zur Bildung des so genannten inflammatorischen Th1 (86) (98) mit einem typischen Zytokinmuster: IFN-gamma, TNF-alpha/beta, IL-2 und IL-12. (24) (66) Unter diesen sogenannten Th1-Zytokinen kommt es zu einer Aktivierung von CD8+ T-Zellen und zur Prägung von zytotoxischen T-Zellen, welche eine Tumorlyse durch Freisetzung von Perforinen und Granzymen bewirken.



In Tumormodellen der Maus konnte gezeigt werden, dass INF-gamma dabei ein zentrales Zytokin der Tumorabstoßung ist. Es wurden INF-gamma-Antikörper appliziert, darunter kam es zu deutlich geringeren Abstoßungsreaktionen der Tumore. (8) (67) (118)

IL-12 induziert in NK- und T-Zellen die Bildung von IFN-gamma. (31) (49) (94) IFN-gamma wiederum hat auch einen direkten Effekt auf Tumorzellen und aktiviert weitere immunkompetente Zellen. Von Xie und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass IFN-gamma die Bildung von iNOS Genen induziert. (112) NOS selbst kann dann wiederum als tumorlytischer Faktor wirken. (45-47;62;63)

Auch Tannenbaum und Mitarbeiter konnten in einem Nierenkarzinom Modell zeigen, dass es unter der IL-12 Wirkung zu einer Induktion von IFN-gamma kam. (100) Dies wiederum führte zu einer Infiltration von CD8+ T-Zellen und Mac-1 positiven Zellen im Tumorgewebe. Zudem konnten lytische Faktoren wie Perforin und Granzym B nachwiesen werden.

In einer Arbeit von Haicheur und Mitarbeitern konnte im humanen Bereich gezeigt werden, dass eine s. c. IL-12 Applikation zu einem Anstieg vor allem von IFN-gamma und weiteren Faktoren wie TNF-alpha, IP-10, MIG, IL-10 und IL-4 führte. (35) Immer wieder wird eine direkte Verknüpfung von IFN-gamma mit Interleukin-12 dargestellt. Es scheint so, als würde eine Tumorabstoßung ohne INF-gamma nicht möglich sein.

Die gute und breite Wirksamkeit des INF-gamma in den verschiedenen Tumormodellen hängt mit der Verbreitung des INF-gamma-Rezeptors zusammen. Dieser ist auf vielen verschiedenen Zellen einschließlich Tumorzellen nachweisbar (7), während der IL-12-Rezeptor nur auf T-Zellen und NK-Zellen nachgewiesen werden konnte. (98) (111)

In diesem GL261 Modell wurde anhand von IFN-gamma-K.O.-Mäusen die Wirkung von IL-12 auf die Tumorgröße untersucht. In der GF-IL12 INF-gamma-K.O.-Gruppe fanden sich kleinere Tumervolumina als in der Wt K.O.-Gruppe. Damit wurde in unserem Modell bewiesen, dass INF-gamma nicht erforderlich ist, um eine Abstoßung des Tumors GL261 zu bewerkstelligen. Die durchschnittliche Differenz der Tumervolumina zwischen den IL12-transgenen- und Wt-INF-gamma-K.O.-Versuchstieren entsprach dem Wt/IL-12 Modell von 64 %.

Eine IFN-gamma Suppression führte in verschiedenen Tumormodellen zu einem verminderten oder kompletten Ausfall der Abstoßungsreaktion. (114) (118) Aufgrund des unabhängigen Effektes von IFN-gamma muss es aber auch eine IFN-gamma unabhängige IL-12 vermittelte Abstoßungsreaktion geben. Comes und Kollegen konnten bei einem Adenokarzinommodell in IFN-gamma K.O. Mäusen nachweisen, dass es zu einer zellulären Tumordinfiltration von CD8+ Zellen, Granulozyten, NK Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen gekommen war. (21)

Zilocchi und Mitarbeiter zeigten anhand eines IFN-gamma K.O.-Modells, dass das Kolonkarzinom C26 auch ohne INF-gamma über eine Aktivierung von CD4+ T-Zellen abgestoßen werden kann. (115)

Wir gehen davon aus, dass die Abstoßung der Tumorzellen nicht obligat über INF-gamma ablaufen muss, sondern dass CD8+ T-Zellen direkt durch IL-12 aktiviert werden können und dies genügend ist für eine Abstoßungsreaktion.

## **5.7 Zukünftige Entwicklungen – Ausblick**

Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen könnte der experimentelle Ansatz in verschiedene Richtungen weiter verfolgt werden. Anhand der klinischen Verläufe ist davon auszugehen, dass die GF-IL12 transgenen Versuchstiere einen deutlichen Überlebensvorteil hatten. Es bliebe zu überprüfen, wie der Verlauf nach vier Wochen weiter gegangen wäre, wobei die Wt-Tiere bereits nach 2-3 Wochen schwer krank wurden. Von Interesse wäre auch, ob die GF-IL12 transgenen Tiere mit den kleinen Tumoren eine vollständige und dauerhafte Abstoßung hätten erreichen können. Die Literatur zeigt, dass komplette und dauerhafte Remissionen möglich sind.

Die IL-12 transgenen Tiere mit sehr großen Tumoren hatten entweder zu wenig IL-12 exprimiert oder der Tumor hatte sich gegen das Immunsystem beispielsweise mit dem Faktor TGF-beta durchgesetzt. Hier könnte man anhand von Sekretionsmessungen die Menge des sezerniertem IL-12 und TGF-beta bestimmen.

Auch die Rolle der T-Zellen könnte über weitere Quantifizierungsmaßnahmen noch besser erklärt werden. So könnte man T-Zellen aus den Gehirnen und den lymphatischen Organen isolieren und anhand eines Release-Assay weiter abklären, welche T-Zellen für die Abstoßung gebraucht werden.

Wir vermuten, dass in den INF-gamma-K.O. Versuchstieren andere Mechanismen zu einer Aktivierung der CD8+ T-Zellen führen und dies zu einer Abstoßung der Tumore führt. Es wäre hier interessant, die Gewebe immunohistochemisch aufzuarbeiten.

Im humanen Bereich spielt die IL-12 Tumorthherapie bisher eine untergeordnete Rolle. Die Applikation ist komplex und mit Nebenwirkungen verbunden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse lässt sich feststellen, dass eine endogen erhöhte IL-12 Applikation ebenfalls eine gute Wirksamkeit gegen das Tumorstadium hat, jedoch auch mit Nebenwirkungen verbunden ist. Möglicherweise ist eine Integration mittels Vektoren in das Erbgut der Tumorzellen eine mögliche und schonende Applikationsform, die in Zukunft angewendet werden könnte.

## 6. Literatur

- (1) Akasaki Y, Kikuchi T, Homma S, Abe T, Kofe D, Ohno T. Antitumor effect of immunizations with fusions of dendritic and glioma cells in a mouse brain tumor model.[comment]. *Journal of Immunotherapy* 2001; 24(2):106-113.
- (2) Ausman JI, Shapiro WR, Rall DP. Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: development of an experimental model. *Cancer Res* 1970; 30(9):2394-2400.
- (3) Bacon CM, Petricoin EF, III, Ortaldo JR, Rees RC, Larner AC, Johnston JA et al. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(16):7307-7311.
- (4) Barnard JA, Lyons RM, Moses HL, Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor beta. [Review] [132 refs]. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1032(1):79-87.
- (5) Barth RJ, Jr., Mule JJ, Spiess PJ, Rosenberg SA, Barth RJJ, Mule JJ et al. Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1991; 173(3):647-658.
- (6) Bear HD. Tumor-specific suppressor T-cells which inhibit the in vitro generation of cytolytic T-cells from immune and early tumor-bearing host spleens. *Cancer Res* 1986; 46(4 Pt 1):1805-1812.
- (7) Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:749-795.
- (8) Brunda MJ, Luistro L, Hendrzak JA, Fountoulakis M, Garotta G, Gately MK. Role of interferon-gamma in mediating the antitumor efficacy of interleukin-12. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1995; 17(2):71-77.
- (9) Brunda MJ, Luistro L, Rumennik L, Wright RB, Dvorozniak M, Aglione A et al. Antitumor activity of interleukin 12 in preclinical models. [Review] [51 refs]. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 38 Suppl:S16-S21.
- (10) Brunda MJ, Luistro L, Rumennik L, Wright RB, Wigginton JM, Wilttrout RH et al. Interleukin-12: murine models of a potent antitumor agent. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 795:266-274.
- (11) Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M et al. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 1993; 178(4):1223-1230.
- (12) Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Biological implications of HLA-DR expression in tumours. [Review] [91 refs]. *Scand J Immunol* 1995; 41(4):398-406.
- (13) Cahlin C, Korner A, Axelsson H, Wang W, Lundholm K, Svanberg E et al. Experimental cancer cachexia: the role of host-derived cytokines interleukin (IL)-

- 6, IL-12, interferon-gamma, and tumor necrosis factor alpha evaluated in gene knockout, tumor-bearing mice on C57 BL background and eicosanoid-dependent cachexia. *Cancer Res* 2000; 60(19):5488-5493.
- (14) Campbell IL, Stalder AK, Akwa Y, Pagenstecher A, Asensio VC. Transgenic models to study the actions of cytokines in the central nervous system. [Review] [58 refs]. *Neuroimmunomodulation* 1998; 5(3-4):126-135.
  - (15) Chambers CA, Allison JP. Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(2):203-210.
  - (16) Chang SM, Lamborn KR, Malec M, Larson D, Wara W, Sneed P et al. Phase II study of temozolomide and thalidomide with radiation therapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 60(2):353-357.
  - (17) Chen B, Timiryasova TM, Andres ML, Kajioka EH, Dutta-Roy R, Gridley DS et al. Evaluation of combined vaccinia virus-mediated antitumor gene therapy with p53, IL-2, and IL-12 in a glioma model. *Cancer Gene Ther* 2000; 7(11):1437-1447.
  - (18) Chen L, Chen D, Block E, O'Donnell M, Kufe DW, Clinton SK. Eradication of murine bladder carcinoma by intratumor injection of a bicistronic adenoviral vector carrying cDNAs for the IL-12 heterodimer and its inhibition by the IL-12 p40 subunit homodimer. *J Immunol* 1997; 159(1):351-359.
  - (19) Chua AO, Chizzonite R, Desai BB, Truitt TP, Nunes P, Minetti LJ et al. Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J Immunol* 1994; 153(1):128-136.
  - (20) Chua AO, Wilkinson VL, Presky DH, Gubler U. Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *J Immunol* 1995; 155(9):4286-4294.
  - (21) Comes A, Di Carlo E, Musiani P, Rosso O, Meazza R, Chiodoni C et al. IFN-gamma-independent synergistic effects of IL-12 and IL-15 induce anti-tumor immune responses in syngeneic mice. *Eur J Immunol* 2002; 32(7):1914-1923.
  - (22) Constantinescu CS, Frei K, Wysocka M, Trinchieri G, Malipiero U, Rostami A et al. Astrocytes and microglia produce interleukin-12 p40. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 795:328-333.
  - (23) Croteau D, Mikkelsen T. Adults with newly diagnosed high-grade gliomas. [Review] [30 refs]. *Curr Treat Options Oncol* 2001; 2(6):507-515.
  - (24) Del Prete G, Maggi E, Romagnani S, Del Prete G, Maggi E, Romagnani S. Human Th1 and Th2 cells: functional properties, mechanisms of regulation, and role in disease. [Review] [75 refs]. *Lab Invest* 1994; 70(3):299-306.
  - (25) Ehteshami M, Kabos P, Kabosova A, Neuman T, Black KL, Yu JS. The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma. *Cancer Res* 2002; 62(20):5657-5663.

- (26) Fallarino F, Uyttenhove C, Boon T, Gajewski TF. Endogenous IL-12 is necessary for rejection of P815 tumor variants in vivo. *J Immunol* 1996; 156(3):1095-1100.
- (27) Fontana A, Constam DB, Frei K, Malipiero U, Pfister HW, Fontana A et al. Modulation of the immune response by transforming growth factor beta. [Review] [58 refs]. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 99(1):1-7.
- (28) Frey AB, Frey AB. Rat mammary adenocarcinoma 13762 expressing IFN-gamma elicits antitumor CD4+ MHC class II-restricted T cells that are cytolytic in vitro and tumoricidal in vivo. *J Immunol* 1995; 154(9):4613-4622.
- (29) Fu T, Shen Y, Fujimoto S, Fu T, Shen Y, Fujimoto S. Tumor-specific CD4(+) suppressor T-cell clone capable of inhibiting rejection of syngeneic sarcoma in A/J mice. *Int J Cancer* 2000; 87(5):680-687.
- (30) Fujiwara H, Fukuzawa M, Yoshioka T, Nakajima H, Hamaoka T, Fujiwara H et al. The role of tumor-specific Lyt-1+2- T cells in eradicating tumor cells in vivo. I. Lyt-1+2- T cells do not necessarily require recruitment of host's cytotoxic T cell precursors for implementation of in vivo immunity. *J Immunol* 1984; 133(3):1671-1676.
- (31) Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R, Gately MK, Wolitzky AG et al. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol* 1992; 143(1):127-142.
- (32) Germann T, Huhn H, Zimmermann F, Rude E, Germann T, Huhn H et al. An antigen-independent physiological activation pathway for L3T4+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1987; 17(6):775-781.
- (33) Gonzales M. The 2000 World Health Organization classification of tumours of the nervous system. [Review] [10 refs]. *J Clin Neurosci* 2001; 8(1):1-3.
- (34) Hafner M, Falk W, Echtenacher B, Mannel DN, Hafner M, Falk W et al. Interleukin-12 activates NK cells for IFN-gamma-dependent and NKT cells for IFN-gamma-independent antimetastatic activity. *Eur Cytokine Netw* 1999; 10(4):541-548.
- (35) Haicheur N, Escudier B, Dorval T, Negrier S, De Mulder PH, Dupuy JM et al. Cytokines and soluble cytokine receptor induction after IL-12 administration in cancer patients. *Clin Exp Immunol* 2000; 119(1):28-37.
- (36) Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, White JM, Shankaran V, Old LJ et al. Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. *Immunity* 2000; 13(2):265-276.
- (37) Hatanpaa KJ, Burger PC, Eshleman JR, Murphy KM, Berg KD. Molecular diagnosis of oligodendroglioma in paraffin sections. *Lab Invest* 2003; 83(3):419-428.
- (38) Hendrzak JA, Brunda MJ, Hendrzak JA, Brunda MJ. Interleukin-12. Biologic activity, therapeutic utility, and role in disease. [Review] [209 refs]. *Lab Invest* 1995; 72(6):619-637.

- (39) Hickey WF, Kimura H, Hickey WF, Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 1988; 239(4837):290-292.
- (39 b) Hofer M, Hausmann J, Staeheli P, et al. Cerebral expression of interleukin-12 induces neurological disease via differential pathways and recruits antigen-specific T cells in virus-infected mice. *Am J Pathol* 2004;165:949Y58
- (40) Ibelgaufits H. Cytokines Online Path Finder Encyclopaedia. <http://www.copewithcytokines.de>. <http://www.copewithcytokines.de> 2003.
- (41) Insug O, Ku G, Ertl HC, Blaszczyk-Thurin M. A dendritic cell vaccine induces protective immunity to intracranial growth of glioma. *Anticancer Res* 2002; 22(2A):613-621.
- (42) Iwasaki M, Yu WG, Uekusa Y, Nakajima C, Yang YF, Gao P et al. Differential IL-12 responsiveness of T cells but not of NK cells from tumor-bearing mice in IL-12-responsive versus -unresponsive tumor models. *Int Immunol* 2000; 12(5):701-709.
- (43) Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, Zhong Z, Schreiber RD, Darnell JE, Jr. et al. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med* 1995; 181(5):1755-1762.
- (44) Jean WC, Spellman SR, Wallenfriedman MA, Hall WA, Low WC. Interleukin-12-based immunotherapy against rat 9L glioma. *Neurosurgery* 1998; 42(4):850-856.
- (45) Kikuchi T, Joki T, Abe T, Ohno T. Antitumor activity of killer cells stimulated with both interleukin-2 and interleukin-12 on mouse glioma cells. *Journal of Immunotherapy* 1999; 22(3):245-250.
- (46) Kikuchi T, Joki T, Saitoh S, Hata Y, Abe T, Kato N et al. Anti-tumor activity of interleukin-2-producing tumor cells and recombinant interleukin 12 against mouse glioma cells located in the central nervous system. *Int J Cancer* 1999; 80(3):425-430.
- (47) Kishima H, Shimizu K, Miyao Y, Mabuchi E, Tamura K, Tamura M et al. Systemic interleukin 12 displays anti-tumour activity in the mouse central nervous system. *Br J Cancer* 1998; 78(4):446-453.
- (48) Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. [Review] [75 refs]. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61(3):215-225.
- (49) Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170(3):827-845.

- (50) Kuppner MC, Hamou MF, Sawamura Y, Bodmer S, de Tribolet N, Kuppner MC et al. Inhibition of lymphocyte function by glioblastoma-derived transforming growth factor beta 2. *J Neurosurg* 1989; 71(2):211-217.
- (51) Laird PW, Zijderfeld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(15):4293.
- (52) Le HN, Lee NC, Tsung K, Norton JA. Pre-existing tumor-sensitized T cells are essential for eradication of established tumors by IL-12 and cyclophosphamide plus IL-12. *J Immunol* 2001; 167(12):6765-6772.
- (53) Lehmann A. *Atlas Stereotaxique Du Cerveau De La Souris*. Book 1974; 1.
- (54) Lenzi R, Rosenblum M, Verschraegen C, Kudelka AP, Kavanagh JJ, Hicks ME et al. Phase I study of intraperitoneal recombinant human interleukin 12 in patients with Mullerian carcinoma, gastrointestinal primary malignancies, and mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2002; 8(12):3686-3695.
- (55) Lichtor T, Glick RP, Kim TS, Hand R, Cohen EP. Prolonged survival of mice with glioma injected intracerebrally with double cytokine-secreting cells. *J Neurosurg* 1995; 83(6):1038-1044.
- (56) Liu Y, Ehtesham M, Samoto K, Wheeler CJ, Thompson RC, Villarreal LP et al. In situ adenoviral interleukin 12 gene transfer confers potent and long-lasting cytotoxic immunity in glioma. *Cancer Gene Ther* 2002; 9(1):9-15.
- (57) Lo CH, Lee SC, Wu PY, Pan WY, Su J, Cheng CW et al. Antitumor and anti-metastatic activity of IL-23. *J Immunol* 2003; 171(2):600-607.
- (58) Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995; 154(10):5071-5079.
- (59) Mai M, Grabs R, Barnes RD, Vafiadis BP, Polychronakos C. Shortened PCR cycles in a conventional thermal cycler. *Biotechniques* 1998; 25(2):208-210.
- (60) Mills CD, North RJ. Ly-1+2- suppressor T cells inhibit the expression of passively transferred antitumor immunity by suppressing the generation of cytolytic T cells. *Transplantation* 1985; 39(2):202-208.
- (61) Monach PA, Meredith SC, Siegel CT, Schreiber H, Monach PA, Meredith SC et al. A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. *Immunity* 1995; 2(1):45-59.
- (62) Moncada S, Higgs EA, Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. [Review] [190 refs]. *Eur J Clin Invest* 1991; 21(4):361-374.
- (63) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA, Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. [Review] [404 refs]. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2):109-142.



- (64) Morrison SD, Moley JF, Norton JA, Morrison SD, Moley JF, Norton JA. Contribution of inert mass to experimental cancer cachexia in rats. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73(4):991-998.
- (65) Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145-173.
- (66) Mosmann TR, Coffman RL, Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. [Review] [221 refs]. *Adv Immunol* 1989; 46:111-147.
- (67) Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, Tahara H, Nalesnik MA, Brunda MJ et al. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J Immunol* 1994; 153(4):1697-1706.
- (68) Newcomb EW, Tamasdan C, Entzminger Y, Arena E, Schnee T, Kim M et al. Flavopiridol inhibits the growth of GL261 gliomas in vivo: implications for malignant glioma therapy. *Cell Cycle* 2004; 3(2):230-234.
- (69) North RJ, Bursucker I. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+ effector T cells. *J Exp Med* 1984; 159(5):1295-1311.
- (70) Okada H, Villa L, Attanucci J, Erff M, Fellows WK, Lotze MT et al. Cytokine gene therapy of gliomas: effective induction of therapeutic immunity to intracranial tumors by peripheral immunization with interleukin-4 transduced glioma cells. *Gene Ther* 2001; 8(15):1157-1166.
- (71) Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13(5):715-725.
- (72) Oshikawa K, Rakhmievich AL, Shi F, Sondel PM, Yang N, Mahvi DM et al. Interleukin 12 gene transfer into skin distant from the tumor site elicits antitumor effects equivalent to local gene transfer. *Hum Gene Ther* 2001; 12(2):149-160.
- (73) Pagenstecher A, Lassmann S, Carson MJ, Kincaid CL, Stalder AK, Campbell IL et al. Astrocyte-targeted expression of IL-12 induces active cellular immune responses in the central nervous system and modulates experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 2000; 164(9):4481-4492.
- (74) Park SH, Kyin T, Bendelac A, Carnaud C. The contribution of NKT cells, NK cells, and other gamma-chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors. *J Immunol* 2003; 170(3):1197-1201.
- (75) Parker JN, Gillespie GY, Love CE, Randall S, Whitley RJ, Markert JM. Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(5):2208-2213.
- (76) Parvez T. Present trend in the primary treatment of aggressive malignant glioma: glioblastoma multiforme. *Technol Cancer Res Treat* 2008; 7(3):241-248.

- (77) Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, Chan WF, Anderson CC, Lantz O et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood* 2007; 109(12):5346-5354.
- (78) Portielje JE, Kruit WH, Schuler M, Beck J, Lamers CH, Stoter G et al. Phase I study of subcutaneously administered recombinant human interleukin 12 in patients with advanced renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5(12):3983-3989.
- (79) Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY et al. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(24):14002-14007.
- (80) Rakhmievich AL, Janssen K, Turner J, Culp J, Yang NS, Rakhmievich AL et al. Cytokine gene therapy of cancer using gene gun technology: superior anti-tumor activity of interleukin-12. *Hum Gene Ther* 1997; 8(11):1303-1311.
- (81) Rakhmievich AL, Turner J, Ford MJ, McCabe D, Sun WH, Sondel PM et al. Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(13):6291-6296.
- (82) Reifenberger G, Louis DN. Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. [Review] [111 refs]. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62(2):111-126.
- (83) Ren H, Boulikas T, Lundstrom K, Soling A, Warnke PC, Rainov NG et al. Immunogene therapy of recurrent glioblastoma multiforme with a liposomally encapsulated replication-incompetent Semliki forest virus vector carrying the human interleukin-12 gene--a phase I/II clinical protocol.[erratum appears in *J Neurooncol*. 2003 Nov;65(2):191]. *J Neurooncol* 2003; 64(1-2):147-154.
- (84) Rich JN, Rich JN. The role of transforming growth factor-beta in primary brain tumors. [Review] [198 refs]. *Front Biosci* 2003; 8:e245-e260.
- (85) Rochlitz CF. Gene therapy of cancer. [Review] [13 refs]. *Swiss Med Wkly* 2001; 131(1-2):4-9.
- (86) Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U et al. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 1997; 185(5):825-831.
- (87) Roy EJ, Gawlick U, Orr BA, Rund LA, Webb AG, Kranz DM. IL-12 treatment of endogenously arising murine brain tumors. *J Immunol* 2000; 165(12):7293-7299.
- (88) Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W et al. Cloning and expression of murine IL-12. *J Immunol* 1992; 148(11):3433-3440.
- (89) Seligman AM, Shear MJ. Studies in Carcinogenesis. VIII. Experimental production of brain tumors in Mice with Metylcholanthrene. *Am J Cancer*.1939 , 364-395. 2003.

- (90) Shapiro WR. Further studies on chemotherapy of experimental brain tumors. *Neurology* 1970; 20(4):390-391.
- (91) Shi F, Rakhmilevich AL, Heise CP, Oshikawa K, Sondel PM, Yang NS et al. Intratumoral injection of interleukin-12 plasmid DNA, either naked or in complex with cationic lipid, results in similar tumor regression in a murine model. *Molecular Cancer Therapeutics* 1(11):949-57, 2002.
- (92) Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S, Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999; 163(10):5211-5218.
- (93) Stalder AK, Pagenstecher A, Yu NC, Kincaid C, Chiang CS, Hobbs MV et al. Lipopolysaccharide-induced IL-12 expression in the central nervous system and cultured astrocytes and microglia. *J Immunol* 1997; 159(3):1344-1351.
- (94) Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, Pan YC, Quinn PM, Wolitzky AG et al. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(17):6808-6812.
- (95) Strassmann G, Fong M, Kenney JS, Jacob CO., Strassmann G, Fong M et al. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest* 1992; 89(5):1681-1684.
- (96) Surawicz TS, Davis F, Freels S, Laws ER, Jr., Menck HR. Brain tumor survival: results from the National Cancer Data Base. *J Neurooncol* 1998; 40(2):151-160.
- (97) Svaninger G, Gelin J, Lundholm K, Svaninger G, Gelin J, Lundholm K. The cause of death in non-metastasizing sarcoma-bearing mice. A study with relevance for tumor treatment experiments in mice. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; 25(9):1295-1302.
- (98) Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997; 185(5):817-824.
- (99) Tahara H, Zitvogel L, Storkus WJ, Robbins PD, Lotze MT. Murine models of cancer cytokine gene therapy using interleukin-12. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 795:275-283.
- (100) Tannenbaum CS, Wicker N, Armstrong D, Tubbs R, Finke J, Bukowski RM et al. hCytokine and chemokine expression in tumors of mice receiving systemic therapy with IL-12. *J Immunol* 1996; 156(2):693-699.
- (101) Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT et al. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 1996; 382(6587):171-174.
- (102) Trinchieri G, Trinchieri G. Biology of natural killer cells. [Review] [1182 refs]. *Adv Immunol* 1989; 47:187-376.

- (103) Trinchieri G, Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. [Review] [97 refs]. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:251-276.
- (104) Trinchieri G, Trinchieri G. The two faces of interleukin 12: a pro-inflammatory cytokine and a key immunoregulatory molecule produced by antigen-presenting cells. [Review] [59 refs]. *Ciba Found Symp* 1995; 195:203-214.
- (105) Trinchieri G, Trinchieri G. Role of interleukin-12 in human Th1 response. [Review] [79 refs]. *Chem Immunol* 1996; 63:14-29.
- (106) Vose BM, Moore M. Human tumor-infiltrating lymphocytes: a marker of host response. [Review] [119 refs]. *Seminars in Hematology* 1985; 22(1):27-40.
- (107) Weller M, Fontana A, Weller M, Fontana A. The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. [Review] [254 refs]. *Brain Res Brain Res Rev* 1995; 21(2):128-151.
- (108) Wilмотte R, Burkhardt K, Kindler V, Belkouch MC, Dussex G, Tribolet N et al. B7-homolog 1 expression by human glioma: a new mechanism of immune evasion. *Neuroreport* 2005; 16(10):1081-1085.
- (109) Wiltshire RN, Rasheed BK, Friedman HS, Friedman AH, Bigner SH. Comparative genetic patterns of glioblastoma multiforme: potential diagnostic tool for tumor classification. *Neuro-oncol* 2000; 2(3):164-173.
- (110) Wong HL, Wilson DE, Jenson JC, Familletti PC, Stremlo DL, Gately MK et al. Characterization of a factor(s) which synergizes with recombinant interleukin 2 in promoting allogeneic human cytolytic T-lymphocyte responses in vitro. *Cell Immunol* 1988; 111(1):39-54.
- (111) Wu CY, Warriер RR, Carvajal DM, Chua AO, Minetti LJ, Chizzonite R et al. Biological function and distribution of human interleukin-12 receptor beta chain. *Eur J Immunol* 1996; 26(2):345-350.
- (112) Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256(5054):225-228.
- (113) Yamaki T, Uede T, Kikuchi K. Cellular mechanisms of tumor rejection in rats. [Review] [99 refs]. *Natural Immunity & Cell Growth Regulation* 1990; 9(1):1-25.
- (114) Yu WG, Yamamoto N, Takenaka H, Mu J, Tai XG, Zou JP et al. Molecular mechanisms underlying IFN-gamma-mediated tumor growth inhibition induced during tumor immunotherapy with rIL-12. *Int Immunol* 1996; 8(6):855-865.
- (115) Zilocchi C, Stoppacciarо A, Chiodoni C, Parenza M, Terrazzini N, Colombo MP et al. Interferon gamma-independent rejection of interleukin 12-transduced carcinoma cells requires CD4+ T cells and Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1998; 188(1):133-143.

- (116) Zitvogel L, Couderc B, Mayordomo JI, Robbins PD, Lotze MT, Storkus WJ. IL-12-engineered dendritic cells serve as effective tumor vaccine adjuvants in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 795:284-293.
- (117) Zou J, Presky DH, Wu CY, Gubler U. Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *J Biol Chem* 1997; 272(9):6073-6077.
- (118) Zou JP, Yamamoto N, Fujii T, Takenaka H, Kobayashi M, Herrmann SH et al. Systemic administration of rIL-12 induces complete tumor regression and protective immunity: response is correlated with a striking reversal of suppressed IFN-gamma production by anti-tumor T cells. *Int Immunol* 1995; 7(7):1135-1145.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
APC	Antigene presenting cell (Antigen präsentierende Zelle)
AZ	Allgemeinzustand
CD	cluster of differentiation (Nomenklatur zur Beschreibung von Oberflächen-Antigenen)
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
CLMF	Cytotoxic lymphocyte maturation factor
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DNA	desoxy nucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPM	disintegrations per minute (Zerfälle pro Minute)
EAE	experimentelle allergische Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (-acid)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay (Enzym-gekoppelter Immuntest)
FasL	Fas-Ligand (Oberflächenmolekül)
g	relative Zentrifugalkraft
GL261	Gliom 261
GFAP	glial fibrillar acidic protein (saures Gliafaser-Protein)
GF-IL12	IL-12 transgene Maus
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (colony stimulating factor)

HE	Haematoxylin-Eosin (Farben für Histologie)
i.c.	intrazerebral
ICAM	intracellular adhesion molecule (intrazelluläres Adhäsionsmolekül)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunohistochemie
IL	Interleukin
IL-12p35	p35-Untereinheit des Interleukin-12-Heterodimers
IL-12p40	p40-Untereinheit des Interleukin-12-Heterodimers
IL-12p70	Interleukin-12-Heterodimer
IL-12p(40)2	Interleukin-12p40-Homodimer
IL-12R	Interleukin-12-Rezeptor
IL-12R $\beta$ 1	$\beta$ 1-Kette des Interleukin-12-Rezeptors
IL-12R $\beta$ 2	$\beta$ 2-Kette des Interleukin-12-Rezeptors
iNOS	inducible Nitric Oxide synthase (induzierbare Stickstoffoxid Synthetase)
IP	Interferon induzierbares Protein
IR	Immunoreaktivität
Jak	Januskinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KO	Knock out (ausgeschaltet)
LCMV	lymphocytic choriomeningitis virus
LPS	Lipopolysaccharid
Mac	membrane attack complex
MCP	Monozyten chemotaktisches Protein
MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NKSF	Natural killer stimulatory factor
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NO	nitric oxide (Stickstoffoxid)
NOS	nitic oxide synthesis (Sickstoffoxidsyntheseenzym)
OP	Operation
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)

PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhäsions Molecule (Oberflächenmolekül von Endothelzellen)
rIL	Rekombinates Interleukin
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RP	RNase protection
RPA	RNase protection assay
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit revers transkribierter RNA
sek	Sekunden
STAT	signal transducer and activators of transcription (Signalübermittler und Transkriptionsaktivatoren)
T	Time
TCR	T-Cell-Receptor (T-Zell-Rezeptor)
TGF	Transforming growth factor
tg	transgen
Th	T-Helfer-Zellen
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSF	T-cell stimulatory factor
UTP	Uridin Triphosphat
VCAM	vascular cell adhesion molecule (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
Wt	Wildtyp-Maus
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
ZNS	zentrales Nervensystem

## **8. Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren

in Bern, Schweiz	Prof. Dr. med. Seiler
in Langenthal, Schweiz	Prof. Dr. med. Streuli
in Freiburg, Deutschland	Prof. Dr. med. Pagenstecher
	Prof. Dr. med. Volk
in Marburg, Deutschland	Prof. Dr. med. Pagenstecher



## **9. Danksagung**

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Pagenstecher für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die Unterstützung bis zur Fertigstellung der Dissertation bedanken. In seinem Labor durfte ich sehr viel über das Interleukin-12 erlernen. Mein besondere Dank geht auch an Prof. Müller für das Korreferat und Prof. Jacob für den Prüfungsvorsitz.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Volk, in seinem Institut der Neuropathologie Freiburg konnte ich die Arbeit fertig stellen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts der Neuropathologie Freiburg. Ich konnte in einer angenehmen Atmosphäre viel von ihnen lernen und denke noch oft an die intensive Zusammenarbeit zurück. Danken möchte ich auch den Mitarbeitern des Instituts der Virologie und der Immunologie, wo ein kleiner, aber wichtiger Teil der Arbeit (Facs-Analys, Depletionsexperimente) fertig gestellt wurde.

Mein persönlicher Dank geht an meine Familie. Insbesondere meiner Frau und deren Eltern möchte ich für die verständnisvolle Unterstützung danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich herzlichst bei meiner Mutter und meinem Vater bedanken. Sie gaben mir die Möglichkeiten, das Studium und die Dissertation sorgenfrei abzuschliessen.



## **Joint Meeting of the Belgian, Dutch and German Societies of Neuropathology**

**Also 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie e.V.**

**9–12 October 2002, Aachen, Germany**

**Presidents of the Societies**    **Jan De Bleecker, Gent, Belgium**  
**and Organizers:**                **Pieter Wesseling, Nijmegen, The Netherlands**  
   **J. Michael Schröder, Aachen, Germany**

### **Expression of interleukin 12 in astrocytes promotes glioma rejection**

M. Vetter<sup>1</sup>, A. Pagenstecher<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. Neuropathology, University hospital Freiburg, Germany

Interleukin-12 (IL-12) is a heterodimeric cytokine that plays a central role in promoting T<sub>H</sub>1 immune responses. A number of studies have shown that administration of IL-12 can enhance antitumor immunity in glioma models. To study the effects of cerebral IL-12 expression on gliomas we used transgenic mice (termed GF-IL12 mice) expressing IL-12 under the transcriptional control of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoter. GL261 glioma cells were stereotactically implanted into the cerebellum of wild type and GF-IL12 mice. 3 and 4 weeks after implantation the tumor volume in GF-IL12 amounted to only 36% of the tumor volume in wild type mice. Histological analysis revealed pronounced infiltration of the tumors by T- and B-lymphocytes as well as macrophages in the cerebellum of GF-IL12 mice while there were only few infiltrating mononuclear cells in the cerebellum of wild type mice. Our results demonstrate that brain-derived production of IL-12 can induce pronounced immune responses that may induce glioma rejection.

Supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.